

KESAN ANTIOKSIDAN DAN ANTI-INFLAMASI ADD-X PADA TISU
JANTUNG DALAM TIKUS SPRAGUE-DAWLEY
TEROVARIEKTOMI

KUMESHINI A/P SUKALINGAM

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH SARJANA SAINS
PERUBATAN (ANATOMI)

FAKULTI PERUBATAN

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

KUALA LUMPUR

2017

PENAKUAN

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

17 JULAI 2017

KUMESHINI A/P SUKALINGAM

P77780

PENGHARGAAN

Saya dengan rasa penuh hormat dan rendah diri kepada Tuhan yang maha kaya lagi pengasih, saya ingin mencurahkan rasa syukur yang tidak terhingga kerana saya telah dikurniakan dengan rezeki, masa lapang, pemikiran yang bernas dan kesabaran yang tinggi untuk menyiapkan disertasi ini. Saya mengambil kesempatan untuk menyampaikan sekalung penghargaan khas kepada penyelia, Prof. Madya Dr.Faizah Othman, Dr.Sahema @ Zar Chi Thent (Jabatan Anatomi), Prof. Madya Dr. Qodriyah Haji Mohd Saad dan Prof Kamsiah Jaarin selaku ketua projek (Jabatan Farmakologi). Segala tunjuk ajar, kata-kata semangat, nasihat dan sokongan yang tidak terhingga daripada penyelia sentiasa menjadi pendorong utama dalam melengkapkan dan pelaksanaan kajian serta penulisan disertasi saya.

Ucapan terima kasih saya kepada Ketua Jabatan Anatomi dan Ketua Jabatan Farmakologi bagi sokongan dan kebenaran menjalankan kajian ini di jabatan mereka. Saya juga ingin menyampaikan penghargaan saya kepada semua warga kerja di Jabatan Anatomi dan Farmakologi, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, terutama sekali kepada Puan Nur Aqilah Kamaruddin, Puan Siti Atiqah Zukeri, Puan Siti Norain Baktiar, Encik Ahmad Tarmizi Abdul Razi, En.Mohd Rafizul Mohd Yusf, En.Mohd Fairuz Abdul Rashid, Puan Noor Azlina Zulkelfi, En. Shaiful Ridzwan Sapri, Puan Natasya Nadia Sahrudin dan Puan Nurul Huda Mohd Yusoff. Saya juga ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada warga kerja di Unit Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia Kampus Kuala Lumpur yang memberi bimbingan dan tunjuk ajar dalam pengendalian tikus. Terutamanya Encik Michael Kong See Tau yang telah banyak membantu dalam proses permohonan kelulusan etika haiwan dalam pelaksanaan kajian ini. Jasa baik mereka akan sentiasa di ingatan. Tidak lupa juga penghargaan kepada rakan seperjuangan saya Puan Nurshazana Akmal, Dr.Nurul Raudzah Adib Ridzuan, En.Muhammad Zaid Zainuddin, En.Mohd Maaruf Abdul Malik dan Dr. Gloria Chong Chui Lin yang banyak memberi bantuan dan kata-kata semangat sepanjang kajian ini.

Ucapan terima kasih juga saya ingin titipkan buat Kementerian Pelajaran Malaysia yang telah memberi Geran Penyelidikan dan kesempatan sebagai *Graduate Research Assistant* bagi membiayai kajian saya. Tidak saya lupakan untuk mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada semua pensyarah Jabatan Anatomi dan Jabatan Farmakologi, Fakulti Perubatan Univeristi Kebangsaan Malaysia yang telah banyak menyumbangkan panduan, saranan membina di sepanjang kajian dan penulisan disertasi ini. Akhir sekali, saya sampaikan penghargaan yang sangat istimewa kepada ibu bapa saya, Pn.Sarna Gian Singh dan En.Sukalingam Appoo, sahabat saya serta semua yang secara langsung atau tidak sentiasa menjadi sumber inspirasi saya selama ini. Saya memohon maaf seikhlas hati kepada semua yang telah terlibat dalam penyempurnaan disertasi ini, atas segala salah silap yang telah saya lakukan.

ABSTRAK

Minyak sawit merupakan salah satu sumber utama pengambilan diet asid lemak. Pengambilan minyak sawit yang dipanaskan berulang kali mendedahkan kepada risiko penyakit jantung. Tujuan kajian ini dijalankan adalah untuk menentukan kesan pengambilan ADD-X dan minyak sawit yang dipanaskan berulang kali terhadap sistem kardiak dengan memerhatikan tekanan darah (BP), parameter tekanan oksidatif dan antioksidan, penanda inflamasi dan perubahan mikroskopik dalam tikus terovariektomi (OVX). Empat puluh dua ekor tikus Sprague-Dawley betina dibahagikan secara rawak kepada tujuh kumpulan, dengan enam ekor dalam setiap kumpulan. Semua kumpulan tikus kecuali kumpulan Sham, menjalani prosedur ovariektomi. Kumpulan Sham dan OVX(n) diberikan diet biasa manakala kumpulan OVX(c) diberikan diet diperkaya kolesterol tinggi 2%. Kumpulan tikus yang diberi makan minyak sawit yang dipanaskan lima kali (5HPO) dan sepuluh kali (10HPO) juga diberi diet berkolesterol tinggi 2%. Kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X merupakan kumpulan tikus diberikan 5HPO dan 10HPO yang dicampurkan dengan ADD-X. Tekanan darah (BP) diperhatikan setiap empat minggu sekali melalui kaedah tidak invasif. Selepas 24 minggu rawatan, serum darah diambil bagi mengukur penanda tekanan oksidatif (TBARS) dan parameter antioksidan (SOD, CAT dan GSH). Nilai peroksida (PV) minyak sawit dan ADD-X diukur melalui kaedah piawai titrasi. Selepas tempoh kajian, tikus dibunuh dan tisu jantung diambil, ditimbang dan dihomogenisasi bagi mengukur penanda inflamasi (CRP, TNF- α), penanda biokimia jantung (Troponin, LDH) dan kandungan lipid jantung (TG, FFA). Tisu jantung diambil untuk pemeriksaan histologi. Nilai PV dalam minyak 5HPO dan 10HPO meningkat secara signifikan ($p < 0.05$) tetapi dengan penambahan ADD-X nilai PV menurun secara signifikan ($p < 0.05$). BP, TBARS, kedua-dua penanda inflamasi dan biokimia jantung serta kandungan lipid jantung, kecuali parameter antioksidan, menunjukkan peningkatan secara signifikan bagi kumpulan 5HPO dan 10HPO, sebaliknya menurun secara signifikan selepas penambahan ADD-X. Pemeriksaan histologi dinding jantung bagi kumpulan 5HPO dan 10HPO menunjukkan kedudukan kardiomyosit yang tidak sekata serta mengecut selain kehadiran sel inflamasi di antara gentian otot. Pengambilan minyak sawit dipanaskan berulang kali meningkatkan PV, BP, penanda tekanan oksidatif, kedua-dua penanda inflamasi dan biokimia jantung dan kandungan lipid jantung selain mengurangkan parameter antioksidan. Perubahan di atas dapat dikurangkan melalui pengambilan ADD-X.

EFFECT OF ADD-X EXTRACT ON CARDIAC TISSUE IN OVARECTOMIZED SPRAGUE-DAWLEY RATS

ABSTRACT

Palm oil is one of the primary sources of dietary fatty acid uptake. The intake of the repeatedly heated palm oil predisposes to cardiovascular disorders. The aim of the present study was to determine the effects of consumption of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the cardiac system by observing the BP, oxidative stress and antioxidant parameters, inflammatory markers and microscopic changes in experimental ovariectomized (OVX) rats. Forty two female Sprague-Dawley rats were randomly divided into seven groups with six animals each group. All rats except for the sham group were ovariectomized after being anesthetized. Sham and OvX(n) groups were fed with normal rat chow, while the OvX(c) group was fed with 2% cholesterol rat chow diet. The five times heated palm oil (5HPO) and the ten times heated palm oil groups (10HPO) were also fed with 2 % cholesterol diet. The 5HPO-X and 10HPO-X groups were the 5HPO and 10HPO which were given ADD-X. Blood Pressure (BP) was monitored at four weeks intervals using a non-invasive method. At the end of 24 weeks, blood serum was collected to determine oxidative stress markers (TBARS) and antioxidant parameters (SOD, CAT and GSH). The peroxide value (PV) of the palm oil and ADD-X were calculated by using a standard titration method. After the study period, the rats were sacrificed and cardiac tissues were quickly excised, weighed, and tissues were homogenized to determine the inflammatory biomarkers (CRP, TNF- α) and cardiac biomarkers (Troponin, LDH) and cardiac lipid content (TG, FFA). Heart tissues were harvested for histological examination. The PV in 5HPO, 10HPO oil were significantly increased ($p < 0.05$) but with addition of ADD-X PV values reduced significantly ($p < 0.05$). BP, TBARS, both inflammatory and cardiac biomarkers and cardiac lipid content, but the antioxidant parameters, were also significantly increased in the 5HPO and 10HPO groups, but again reduced significantly when ADD-X was added. Histological examination of the heart wall of the 5HPO and 10HPO showed disarrayed and shrunken cardiomyocytes with presence of inflammatory cells between the muscle fibres. The consumption of repeatedly heated palm oil increased the PV, BP, oxidative stress marker, both inflammatory and cardiac biomarkers, cardiac lipid content but reduced the antioxidant parameters. Those changes were attenuated with ADD-X.

KANDUNGAN

		Halaman
PENGAKUAN		ii
PENGHARGAAN		iii
ABSTRAK		iv
ABSTRACT		v
KANDUNGAN		vi
SENARAI JADUAL		xii
SENARAI ILUSTRASI		xiii
SENARAI SINGKATAN		xviii
SENARAI SIMBOL		xx
BAB I	PENDAHULUAN	1
1.1	Pengenalan	1
	1.1.1 Penyakit jantung koronari	1
	1.1.2 Hipertensi	1
	1.1.3 Penyakit Kardiovaskular	2
1.2	Kepentingan Kajian	5
1.3	Objektif Kajian	6
	1.3.1 Objektif umum	6
	1.3.2 Objektif khusus	6
1.4	Hipotesis	7
BAB II	ULASAN KEPUSTAKAAN	8
2.1	Jantung	8
	2.1.1 Struktur jantung	8
	2.1.2 Perikardium	9
	2.1.3 Struktur dinding jantung	9
2.2	Tekanan Darah Tinggi	12
	2.2.1 Tekanan darah	12
	2.2.2 Sistolik dan diastolik	13
	2.2.3 Klasifikasi tekanan darah	13
	2.2.4 Kitaran jantung	14
	2.2.5 Pengaliran darah melalui jantung	15
2.3	Penyakit Kardiovaskular	16
	2.3.1 Epidemiologi penyakit kardiovaskular	16
	2.3.2 Jenis-jenis penyakit kardiovaskular (CVD)	17
	2.3.3 Faktor-faktor risiko bagi penyakit kardiovaskular	18

2.4	Minyak Kelapa Sawit dan Kegunaannya	19
2.4.1	Kesan pemanasan terhadap minyak kelapa sawit	21
2.4.2	Pengoksidaan kolesterol dalam makanan yang digoreng	25
2.4.3	Patogenesis penyakit kardiovaskular	25
2.5	Antioksidan Semulajadi Dalam Sumber Tumbuhan	30
2.5.1	Tokoferol	30
2.5.2	Flavonoid	31
2.5.3	Asid askorbik	32
2.5.4	Karotenoid	32
2.5.5	Antioksidan semula jadi lain	33
2.6	ADD-X dan Kegunaan Terapeutiknya	33
2.7	Model-Model Experimen	35
BAB III	BAHAN DAN KAEDAH	38
3.1	Bahan	38
3.1.1	Haiwan kajian	38
3.1.2	Bahan kimia	38
3.1.3	Alat radas	42
3.2	Reka Bentuk Kajian	45
3.3	Penyediaan Makanan dan Perlakuan Pada Tikus	48
3.3.1	Penyediaan minyak sawit (5HPO & 10HPO)	48
3.3.2	Penyediaan minyak sawit bersama ekstrak ADD-X	48
3.3.3	Penyediaan makanan tikus kajian	49
3.3.4	Pemberian makanan tikus kajian	49
3.3.5	Pengukuran berat badan tikus kajian	50
3.3.6	Persampelan serum darah tikus kajian	50
3.3.7	Persampelan tisu jantung tikus kajian	50
3.4	Penentuan Nilai Peroksida	50
3.4.1	Pemiawaian larutan natrium tiosulfat	51
3.4.2	Penentuan nilai peroksida dalam sampel minyak kajian	52
3.5	Pengukuran Tekanan Darah Tikus Kajian	54
3.6	Pemprosesan Serum Darah Untuk Ujian Biokimia	54
3.7	Penentuan Parameter Antioksidan Dan Penanda Tekanan Oksidatif	55
3.7.1	Penentuan aras katalase (CAT)	55
3.7.2	Penentuan aras superoksida dismutase (SOD)	55
3.7.3	Penentuan aras glutation (GSH)	55
3.7.4	Penentuan aras bahan reaktif asid tiobarbiturik (TBARS)	56

3.8	Penentuan Berat Tisu Jantung	56
3.9	Pemrosesan Tisu Jantung Untuk Ujian Biokimia	56
3.10	Penentuan Parameter Biokimia Dalam Tisu Jantung	57
	3.10.1 Penentuan aras protein C-reaktif (CRP)	57
	3.10.2 Penentuan aras faktor- α nekrosis tumor (TNF- α)	57
	3.10.3 Penentuan aras troponin	57
	3.10.4 Penentuan aras laktat dehidrogenase (LDH)	57
	3.10.5 Penentuan aras asid lemak bebas (FFA)	58
	3.10.6 Penentuan aras trigliserida (TG)	58
3.11	Pemrosesan Tisu Jantung untuk Histologi	58
	3.11.1 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin	59
	3.11.2 Pewarnaan <i>Oil-Red-O</i>	60
3.12	Kajian Morfometri Jantung	62
3.13	Analisis Statistik	63
BAB IV	HASIL KAJIAN	64
4.1	Nilai Peroksida	64
4.2	Pertumbuhan Tikus dan Pengambilan Makanan	65
	4.2.1 Peratusan pengambilan makanan	65
	4.2.2 Berat badan tikus	66
4.3	Tekanan Darah	67
	4.3.1 Tekanan darah sistolik	67
	4.3.2 Tekanan darah diastolik	68
	4.3.3 Tekanan darah min	69
4.4	Paras Parameter Antioksidan dan Penanda Oksidatif	70
	4.4.1 Paras superoksida dismutase (SOD)	70
	4.4.2 Paras katalase (CAT)	71
	4.4.3 Paras glutation (GSH)	72
	4.4.4 Paras bahan reaktif asid tiobarbiturik (TBARS)	73
4.5	Berat Tisu Jantung	74
4.6	Penanda Inflamasi	75
	4.6.1 Paras protein C-reaktif (CRP)	75
	4.6.2 Paras faktor- α nekrosis tumor (TNF- α)	76
4.7	Penanda Biokimia Jantung	77
	4.7.1 Paras troponin	77
	4.7.2 Paras laktat dehidrogenase (LDH)	78
4.8	Kandungan Lipid Jantung	79

4.8.1	Paras asid lemak bebas (FFA)	79
4.8.2	Paras trigliserida (TG)	80
4.9	Kajian Histologi	81
4.9.1	Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin	81
4.9.2.	Histologi pewarnaan <i>Oil-Red- O</i>	83
4.10	Histomorfometri Tisu Jantung	85
4.10.1	Lebar kardiomiosit	85
4.10.2	Saiz Nukleus Kardiomiofiber	86
4.10.3	Jumlah Nukleus Kardiomiofiber	87
BAB V	PERBINCANGAN	88
5.1	Nilai Peroksida	88
5.2	Kajian Pertumbuhan Tikus dan Pengambilan Makanan	89
5.3	Kajian Tekanan Darah	90
5.4	Kajian Biokimia	93
5.4.1	Penanda Tekanan Oksidatif dan Parameter Antioksidan	93
5.4.2	Penanda Inflamasi	94
5.4.3	Penanda Biokimia Jantung	95
5.4.4	Kandungan Lipid dan Berat Jantung	96
5.5	Kajian Histologi Tisu Jantung	97
5.5.1	H & E	97
5.5.2	Oil-Red-O	98
5.6	Kajian Histomorfometri Tisu Jantung	99
BAB VI	KESIMPULAN DAN CADANGAN PENAMBAHBAIKAN	103
6.1	Kesimpulan	103
6.2	Limitasi Kajian	104
6.3	Cadangan Penambahbaikan Kajian di Masa Hadapan	104
RUJUKAN		106
LAMPIRAN		121
Lampiran A	Sijil Kelulusan Etika Kajian Haiwan	121
Lampiran B	Surat Kelulusan Menjalankan Penyedilikan di Ukm	122
Lampiran C	Prosedur Kit CAT	123

Lampiran D	Prosedur Kit SOD	125
Lampiran E	Prosedur Kit GSH	127
Lampiran F	Prosedur Kit TBAR	129
Lampiran G	Prosedur Kit CRP	131
Lampiran H	Prosedur Kit TNF- α	133
Lampiran I	Prosedur Kit Troponin	135
Lampiran J	Prosedur Kit LDH	138
Lampiran K	Prosedur Kit FFA	139
Lampiran L	Prosedur Kit TG	140
Lampiran M	Jadual Pemprosesan Tisu Automatik	141
Lampiran N	Penyediaan Larutan Hematoksilin	142
Lampiran O	Penyediaan Larutan Eosin	143
Lampiran P	Carta aliran kaedah pemprosesan tisu jantung	144
Lampiran Q	Carta aliran bagi proses pewarnaan H&E	145
Lampiran R	Sijil Bengkel Epidemiologi Klinikal dan Methodologi Kajian	146
Lampiran S	Sijil Bengkel Pengenalan dan Pengurusan Haiwan Makmal	147
Lampiran T	Pembentangan Poster di <i>International Conference on Advance in Medical Sciences</i>	148
Lampiran U	Sijil Penyertaan dan Pembentangan Poster Icams	149
Lampiran V	Manuskrip Yang Telah Diterima Dan Diterbitkan oleh <i>International Journal of Pharmacology</i>	150
Lampiran W	Manuskrip Yang Telah Diterima Dan Diterbitkan oleh <i>International Journal of Toxicology and Pharmacology Research</i>	159
Lampiran X	Manuskrip Yang Telah Diterima Dan Diterbitkan oleh <i>Medicine and Health</i>	168

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
Jadual 2.1	Klasifikasi tekanan darah	14
Jadual 2.2	Kandungan Asid Lemak di dalam minyak sawit	20
Jadual 2.3	Kandungan Karotenoid dan Tokoferol di dalam minyak sawit	21



SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
Rajah 2.1	Pandangan anterior jantung bahagian eksterior	9
Rajah 2.2	Histologi otot jantung keratan memanjang	11
Rajah 2.3	Pandangan anterior jantung bahagian interior	12
Rajah 2.4	Kegunaan kelapa sawit dalam industri makanan	20
Rajah 2.5	Kesan minyak yang dipanaskan berulang kali	23
Rajah 2.6	Mekanisme pengoksidaan lipid	24
Rajah 2.7	Patogenesis penyakit kardiovaskular	26
Rajah 3.1	Reka bentuk kajian	47
Rajah 3.2	Carta aliran bagi proses pewarnaan <i>Oil-Red-O</i>	61
Rajah 4.1	Nilai peroksida (meq/kg) dalam minyak sawit segar (FPO) yng dipanaskan tanpa dan dengan ADD-X	64
Rajah 4.2	Purata pengambilan makanan seminggu oleh tikus dalam kumpulan kawalan (Sham), ovariektomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariektomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X).	65

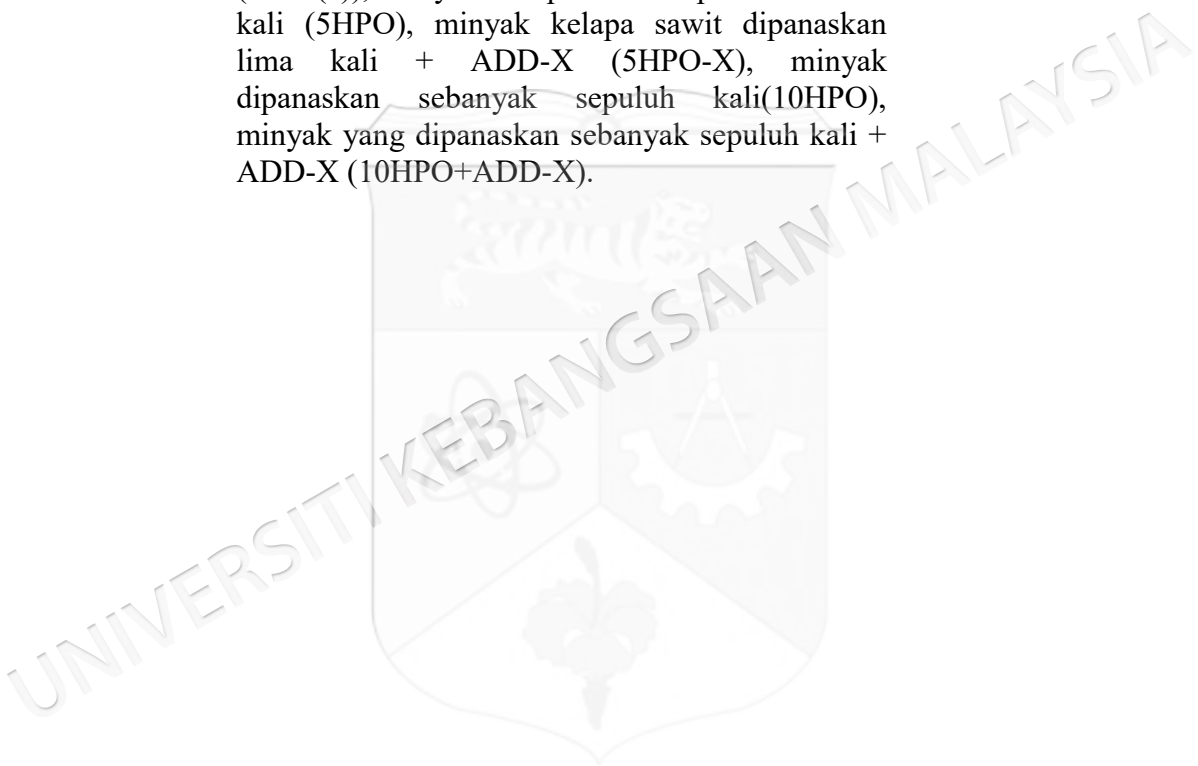
- Rajah 4.3 Peratusan perubahan berat badan tikus dalam kumpulan kawalan (Sham), ovariektomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariektomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 66
- Rajah 4.4 Perbezaan tekanan darah sistolik dalam kumpulan kawalan (Sham), ovariektomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariektomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 67
- Rajah 4.5 Perbezaan tekanan darah diastolik dalam kumpulan kawalan (Sham), ovariektomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariektomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 68
- Rajah 4.6 Perbezaan tekanan darah min dalam kumpulan kawalan (Sham), ovariektomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariektomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 69

- Rajah 4.7 Paras SOD serum dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 70
- Rajah 4.8 Paras CAT serum dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 71
- Rajah 4.9 Paras GSH serum dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 72
- Rajah 4.10 Paras TBAR serum dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 73

- Rajah 4.11 Berat tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 74
- Rajah 4.12 Paras CRP tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 75
- Rajah 4.13 Paras TNF- α tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 76
- Rajah 4.14 Paras troponin tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 77

- Rajah 4.15 Paras LDH tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 78
- Rajah 4.16 Paras FFA tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 79
- Rajah 4.17 Paras TG tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 80
- Rajah 4.18 Lebar Kardiomyofiber dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali(10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 85

- Rajah 4.19 Saiz Nukleus Kardiomyofiber dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 86
- Rajah 4.20 Kiraan nukleus kardiomyofiber dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). 87



No. Fotomikrograf		Halaman
Fotomikrograf 4.1	Pewarnaan H & E pada tisu jantung tikus:	82
	a. Kumpulan SHAM	
	b. Kumpulan OVX(n)	
	c. Kumpulan OVX(c)	
	d. Kumpulan 5HPO	
	e. Kumpulan 5HPO-X	
	f. Kumpulan 10HPO	
	g. Kumpulan 10HPO-X	
Fotomikrograf 4.2	Pewarnaan <i>Oil-Red-O</i> pada tisu jantung tikus:	85
	a. Kumpulan SHAM	
	b. Kumpulan OVX (n)	
	c. Kumpulan OVX (c)	
	d. Kumpulan 5HPO	
	e. Kumpulan 5HPO-X	
	f. Kumpulan 10HPO	
	g. Kumpulan 10HPO-X	

SENARAI SINGKATAN

10HPO	minyak kelapa sawit dipanaskan sepuluh kali
10HPO-X	minyak kelapa sawit dengan penambahan ekstrak add-x dipanaskan sepuluh kali
1HPO	minyak kelapa sawit dipanaskan satu kali
1HPO-X	minyak kelapa sawit dengan penambahan ekstrak add-x dipanaskan satu kali
5HPO	minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima kali
5HPO-X	minyak kelapa sawit dengan penambahan ekstrak add-x dipanaskan lima kali
A	kuinina tokoferil
ADD-X	ekstrak <i>additive-x</i>
AH•	tokoferil semikuinina radikal
AH ₂	alfa tokoferol
AV	atrioventrikular
BP	tekanan darah
Ca ²⁺	kalsium
CAT	katalase
CHD	penyakit jantung koronari
CoA	enzim ko-A
COP	pengoksidaan kolesterol
CRP	protein C-reaktif
DBP	tekanan darah diastolik
DNA	asid dioksi ribonukleik
DPX	bahan pelekat slaid
EKG/ECG	elektrokardiogram
FA	asid lemak
FFA	asid lemak bebas
FPO	minyak kelapa sawit segar
FPO-X	minyak kelapa sawit segar dengan penambahan ekstrak add-x
GSH	glutathion

H&E	hematoksilin dan eosin
H ₂ O ₂	hidrogen peroksida
HDL	lipoprotein ketumpatan tinggi
HHS	Jabatan Kesihatan dan Perkhidmatan Manusia Amerika Syarikat
I ₂	iodin
ICAM-1	molekul-1 lekatan interselel
IFN- γ	interferon-gamma
IHD	penyakit iskemia jantung
JNC	' <i>Joint National committee</i> '
LDL	lipoprotein ketumpatan rendah
MI	infarksi miokardium
mmHg	millimeter merkuri
MUFA	asid lemak monotaktepu
NADH	dinukleotid hidrogen nikotinamid adenin
O ₂	oksigen
O ²⁻	oksigen anion
ORO	<i>oil-red-o</i>
OVX(c)	ovariektomi dengan diet 2% kolesterol
OVX(n)	ovariektomi dengan diet asas tikus
PDGF	faktor pertumbuhan platelet
PUFA	asid lemak politaktepu
r.p.m	rotasi per minit
R•	radikal alkil
RH	asid lemak
RHD	penyakit jantung reumatik
RNA	asid ribonukleik
ROO•	radikal peroksil
ROS	spesies oksigen reaktif
SA	sinoatrial
SBP	tekanan darah sistolik
SHAM	kumpulan kawalan
SFA	asid lemak tepu
SOD	superoksida dismutase

TBARS	bahan reaktif asid tiobarbiturik
TGF- β	faktor-beta pertumbuhan transformasi
TG	trigliserida
TNF- α	faktor-alfa nekrosis tumor
USDA	Jabatan Pertanian Amerika Syarikat
VCAM-1	molekul-1 lekatan sel vaskular
WHO	Pertubuhan Kesihatan Sedunia



SENARAI SIMBOL

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gamma
μ	Mikro
$^{\circ}\text{C}$	Darjah Celsius
%	Peratus



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

1.1.1 Penyakit Jantung Koronari

Penyakit jantung koronari (CHD) merupakan penyebab utama kematian dan kesakitan dalam negara yang sedang membangun (Stocker dan Keaney, 2004). Dianggarkan bahawa menjelang tahun 2020, kira-kira 20 juta orang akan meninggal akibat CHD, yang menjadi salah satu punca utama kematian (WHO, 2008). Faktor utama penyakit jantung koronari ialah hiperlipidemia, tekanan darah tinggi dan juga kencing manis. CHD biasanya dikaitkan dengan peningkatan umur, sejarah keluarga, menghisap rokok dan diet yang tidak seimbang serta diet yang tidak mengikut piramid makanan (Schoen, 2005). Kejadian CHD dikalangan para wanita melebihi umur 50 tahun semakin meningkat dengan ketara. Dalam keadaan menopause, hormon estrogen yang diketahui boleh memberi kesan perlindungan terhadap sistem kardiovaskular dalam kalangan wanita juga mulai berkurang. Salah satu cara yang terbaik untuk mencegah CHD dalam kalangan masyarakat adalah dengan mengubah tabiat pemakanan termasuk mengurangkan penggunaan lemak tepu haiwan.

1.1.2 Hipertensi

Hipertensi merupakan salah satu faktor utama penyakit kardiovaskular (CVD). Hal ini telah menyumbang kepada punca utama mortaliti di negara-negara maju dan sedang pesat

membangun (Lopez et al. 2006). Berdasarkan laporan *Joint National Committee (JNC) on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood pressure* yang ke-6 tekanan darah tinggi telah ditakrifkan sebagai tekanan darah sistolik (SBP) yang melebihi 140 mmHg dan tekanan darah diastolik (DBP) yang melebihi 90 mmHg (Chobanian et al. 2003). Pesakit di peringkat pra-hipertensi, mempunyai bacaan SBP diantara 120 mmHg dan 139 mmHg atau bacaan DBP diantara 80 mmHg ke 89 mmHg, mempunyai risiko yang tinggi dan memerlukan rawatan perubatan (Chobanian et al., 2003). Hal ini telah dihipotesiskan bahawa tekanan darah tinggi berkait rapat dengan ketidakseimbangan antioksidan dan oksigen reaktif spesies (ROS) (Patil et al. 2008).

1.1.3 Penyakit Kardiovaskular

Penyakit kardiovaskular yang bermula dengan aterosklerosis ialah penyakit kronik progresif yang menjejaskan arteri. Penyakit ini akan menyebabkan aliran darah berkurangan sehingga boleh membawa kepada pelbagai penyakit seperti penyakit arteri koronari dan penyakit serebrovaskular. Pengambilan makanan kolesterol yang tinggi dalam diet boleh menyebabkan salah satu faktor dan mempunyai risiko yang tinggi dalam pembentukan aterosklerosis (Guido dan Isabelle, 2004).

Aterosklerosis biasanya dikaitkan dengan peredaran lipoprotein berketumpatan rendah (LDL). Lemak asid poli taktepu dalam lipoprotein ini akan terdedah kepada pengoksidaan radikal bebas. Seterusnya, LDL oksidatif yang berubah ini akan diselubungi oleh makrofaj dan membentuk kolesterol sarat sel buih dalam plak aterosklerotik (Maxwell dan Lip, 1997). Tambahan pula, LDL ini adalah kemopenarik (*chemoattractants*) untuk makrofaj dan sel otot licin (Quinn et al. 1987). Pembentukan plak ateroma ini mempunyai kaitan dengan tindakan faktor pertumbuhan dan angiogenesis molekul kecil vasoaktif yang dihasilkan oleh sel mast (Libby et al. 2009). Beberapa bukti telah menunjukkan bahawa pembentukan plak dikaitkan dengan penghasilan spesies oksigen reaktif yang mendorong kepada kerosakan pada dinding arteri (Lusis, 2000).

Minyak sawit merupakan salah satu minyak masak yang biasa digunakan oleh masyarakat Malaysia. Ia mengandungi 50% lemak tidak tepu dan 50% lemak tepu (Edem, 2002). Terdapat pelbagai jenis minyak sayuran yang berada di pasaran seperti minyak

kelapa, minyak kacang tanah, minyak zaitun dan minyak soya yang disarankan untuk kegunaan harian kerana mempunyai kandungan tinggi asid lemak monotaktepu (MUFA) dan asid lemak politaktepu (PUFA) (Chahoud et al. 2004).

Pengambilan lemak tepu dipercayai mempengaruhi penyakit kardiovaskular (CVD). Minyak sawit segar dikatakan mengandungi tokoferol dan tokotrienol yang merupakan antioksidan. Kesan kebaikan antioksidan tokotrienol adalah 40 hingga 60 kali lebih tinggi daripada tokoferol (Serbinova et al. 1991). Dirantau Asia, proses penggorengan adalah salah satu kaedah yang biasa digunakan dalam penyediaan makanan. Dalam proses ini, lemak yang digunakan dalam diet telah terdedah kepada suhu yang melampau semasa memasak. Tambahan pula, amalan penggunaan semula minyak secara berulang kali untuk menggoreng telah tersebar luas dalam usaha untuk menjimatkan kos. Pemanasan secara berulang kali meningkatkan pengoksidaan lipid dan mengurangkan sifat antioksidan minyak yang boleh menghasilkan radikal bebas (Adam et al. 2007). Selain itu, radikal tekanan oksidatif juga dikaitkan dengan faktor yang menyebabkan aterosklerosis (Maxwell dan Lip, 1997). Oleh itu, penggunaan minyak yang dipanaskan secara berulang-kali boleh menghasilkan kesan yang merbahaya sehingga boleh menyebabkan aterosklerosis.

Minyak yang dipanaskan berulang kali akan mengalami perubahan dalam penampilan fizikal seterusnya mengalami satu siri tindak balas kimia seperti pengoksidaan, hidrolisis dan pempolimeran. Proses ini kemudian akan mengubah komposisi asid lemak tersebut (Choe dan Min, 2007). Oleh sebab itu, apabila tahap tidak tepu dalam asid lemak semakin tinggi, ia lebih mudah terdedah kepada pengoksidaan lipid (Choe dan Min, 2007). Hidrolisis akan menghasilkan asid lemak bebas yang teroksida, kemudian menghasilkan peroksida dan sebatian hidroperoksida. Selain itu hidrolisis juga menghasilkan produk pengoksidaan lipid sekunder seperti aldehid, keton dan alkohol (Oziewicz dan Tymoszczyk, 2005; Choe dan Min, 2006). Seterusnya, pengambilan produk pengoksidaan mempunyai pelbagai kesan buruk, seperti penyakit jantung, tekanan darah tinggi dan penyakit buah pinggang (Owu et al. 1998; Totani dan Ojiri, 2007).

Pendedahan kepada proses pemanasan meningkatkan produk peroksidaan lipid dan menghilangkan semua fungsi vitamin dan seterusnya akan meningkatkan risiko

penyakit kardiovaskular dan aterosklerosis (Leong et al. 2012; Jaarin et al. 2011). Minyak yang dipanaskan akan menyebabkan kecederaan pada tisu buah pinggang (Totani dan Ojiri, 2007) dan juga saluran darah (Adam et al. 2009). Kesan ini akan menjadi lebih ketara apabila berlakunya kekurangan hormon estrogen. Kadar estrogen yang rendah telah dilaporkan sebagai penyebab berlakunya risiko aterosklerosis (Koh, 2002). Pengambilan minyak sawit yang dipanaskan berulang kali serta diet kolesterol tinggi telah menyebabkan berlakunya kecederaan sel endotelial, kerosakan kepada lamina elastik dalaman aorta dan berlakunya pengumpulan lemak pada tisu aorta tikus terovariektomi (Adam et al. 2009). Minyak sawit adalah agen antioksidan yang baik kerana mempunyai kandungan tokotrienol dan tokoferol yang tinggi lalu membantu dalam mengurangkan risiko penyakit jantung koronari (Budin et al. 2009; Edem, 2002). Minyak sawit boleh melindungi daripada kerosakan oksidatif.

Kebanyakan daripada antioksidan yang terdapat di pasaran terdiri daripada bahan kimia sintetik. Terdapat pelbagai keraguan dalam kalangan pengguna terhadap bahan kimia sintetik dalam makanan yang mengandungi kandungan lemak yang tinggi dalam makanan yang bergoreng. Antioksidan sintetik telah dibenarkan untuk digunakan namun hanya dalam had kuantiti yang dibenarkan. Ia sering digunakan dalam industri makanan; kerana keberkesanannya dan kosnya yang rendah. Pada masa kini, penggunaan antioksidan semulajadi agak terhad dalam bidang industri kerana kekurangan dalam pengetahuan mengenai komposisi molekulnya, jumlah bahan-bahan aktif dalam sumber antioksidannya dan tahap kandungan toksik antioksidan semulajadi (Mohamed dan Nor, 2013). Tumbuh-tumbuhan mengandungi banyak sebatian biofenolik yang merupakan anti-oksidatif semulajadi. Sifat redok yang terdapat pada tumbuhan membolehkan ia bertindak sebagai agen penurun, penderma hidrogen, oksigen '*quencher*' tunggal dan pengelat logam.

Banyak kajian telah dilakukan untuk melihat kesan antioksidan tumbuhan seperti daun kesum, kacip fatimah, daun pegaga dan ekstrak daun teh. ADD-X adalah ekstrak yang berasal dari bahagian tumbuhan keluarga Rutaceae yang akan dimasukkan ke dalam komposisi minyak masak untuk mengurangkan penyerapan minyak dalam makanan semasa digoreng (Mohamed dan Nor, 2013). Bahan tambahan ini mempunyai ciri-ciri antioksidan, anti-hipertensi, anti-histamin, anti-kekejangan, anti-bakteria, anti-

hiperkolesterol, anti-keradangan dan mempunyai sifat pelindung kanser dan meningkatkan kualiti, rasa dan kegarangan makanan yang digoreng itu (Danaei et al 2008). Bahan tambahan ini dikenal-pasti terbukti berfungsi sebagai antioksidan lemak asli dan juga perencat penyerapan minyak yang baik untuk kesihatan tubuh badan kerana ia dapat mengurangkan kesan makanan bergoreng terhadap kesihatan tubuh badan (Yadav et al 2008). Ekstrak ini mengandungi sebatian fenolik, seperti pinene, citronellal, terpinen-4-ol, citronellol, citronellil asetat, geranial, asetat geranial, karotenoid, tokoferol, tokotrienol, flavonoid, eriocitrin, neoeriocitrin, narirutin, hesperidin, neohesperidin, didymin, lutein, furocoumarins dan carbazole (Mohamed dan Nor, 2013).

1.2 KEPENTINGAN KAJIAN

Minyak sawit merupakan minyak utama digunakan di rantau Asia. Proses pemanasan minyak secara berulang-kali adalah perkara biasa semasa penyediaan makanan. Kajian ini bertujuan untuk melaporkan risiko penyakit kardiovaskular dengan penggunaan minyak yang dipanaskan berulang-kali dan kesan tambahan ekstrak ADD-X terhadap perubahan diatas. Penggunaan minyak yang dipanaskan secara berulang-kali mungkin mencetuskan peroksidaan lipid sehingga membawa kepada kerosakan dinding arteri. Ini akan meningkatkan pembentukan lipid teroksida yang boleh menyebabkan aterosklerosis. Ia dianggarkan bahawa pengambilan ekstrak ADD-X boleh mengurangkan komplikasi aterosklerosis yang berkaitan dengan penyakit kardiovaskular, lalu mengurangkan kerosakan pada tisu jantung. Dalam kajian ini, parameter fisiologi, biokimia dan histologi tisu jantung tikus dikaji. Parameter fisiologi termasuk pengambilan makanan, berat badan dan tekanan darah; nilai peroksida minyak sawit dengan dan tanpa tambahan ekstrak ADD-X, analisis biokimia dalam serum seperti penanda tekanan oksidatif iaitu bahan reaktif asid tiobarbiturik (TBARS) dan parameter antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), glutathione (GSH), dan katalase (CAT). Analisis biokimia dalam tisu jantung adalah penanda inflamasi seperti protein C-reaktif (CRP) dan faktor- α nekrosis (TNF- α), penanda biokimia jantung seperti troponin dan laktat dehidrogenase (LDH), kandungan lipid jantung seperti trigliserida (TG) dan asid lemak bebas (FFA). Parameter

histologi yang dikaji termasuk tisu yang diwarnakan dengan hematoksilin dan eosin (H&E), *Oil-Red-O* (ORO). Tujuan kajian ini dilakukan untuk melihat kesan ekstrak ADD-X dalam tisu jantung pada tikus terovariektomi, yang boleh membuktikan bahawa makanan tambahan herba ini dapat mengurangkan komplikasi kardiovaskular pada masa hadapan. Selain itu, dengan menggunakan penambahan ADD-X, minyak masak boleh digunakan berulang-kali lalu menjimatkan kos penggunaan. Penambahan ADD-X dalam minyak masak juga dapat meningkatkan kualiti hidup masyarakat dengan mengurangkan kesan negatif minyak yang dipanaskan berulang-kali, justeru mewujudkan masyarakat Malaysia yang lebih sihat.

OBJEKTIF

1.3.1 Objektif Umum

Untuk menentukan kesan inflamasi dan antioksidan ekstrak ADD-X dalam tisu jantung pada tikus terovariektomi.

1.3.2 Objektif Khusus

- a) Untuk menentukan nilai peroksida pada minyak sawit yang dipanaskan tanpa dan penambahan ekstrak ADD-X
- b) Untuk menentukan tekanan darah pada tikus terovariektomi yang dirawat dengan minyak sawit yang dipanaskan tanpa dan penambahan ekstrak ADD-X
- c) Untuk menentukan parameter biokimia dalam serum; penanda tekanan oksidatif (TBARS), parameter antioksidan (SOD, CAT, GSH) pada tikus terovariektomi yang dirawat dengan minyak sawit yang dipanaskan tanpa dan penambahan ekstrak ADD-X
- d) Untuk menentukan parameter biokimia dalam tisu jantung; penanda inflamasi (CRP, TNF- α), penanda biokimia jantung (LDH, troponin) dan kandungan lipid

jantung (FFA, TG) pada tikus terovariektomi yang dirawat dengan minyak sawit yang dipanaskan tanpa dan penambahan ekstrak ADD-X

- e) Untuk mengkaji perubahan histomorfologi tisu jantung di bawah mikroskop cahaya pada tikus terovariektomi yang dirawat dengan minyak sawit yang dipanaskan tanpa dan penambahan ekstrak ADD-X

1.4 HIPOTESIS

- a) Nilai peroksida akan menurun dalam minyak sawit yang dipanaskan dengan penambahan ekstrak ADD-X
- b) Tekanan darah menurun pada tikus terovariektomi yang dirawat dengan minyak sawit yang dipanaskan dengan penambahan ekstrak ADD-X
- c) Pengurangan pada penanda tekanan oksidatif dan peningkatan pada parameter antioksidan dalam serum tikus terovariektomi yang dirawat dengan minyak sawit yang dipanaskan dengan penambahan ekstrak ADD-X
- d) Pengurangan dalam penanda inflamasi, penanda biokimia jantung dan kandungan lipid dalam tisu jantung tikus terovariektomi yang dirawat dengan minyak sawit yang dipanaskan dengan penambahan ekstrak ADD-X
- e) Struktur mikroskopik tisu jantung akan bertambah baik dalam tikus terovariektomi dirawat dengan minyak sawit yang dipanaskan dengan penambahan ekstrak ADD-X di bawah mikroskop cahaya

BAB II

KAJIAN KEPUSTAKAAN

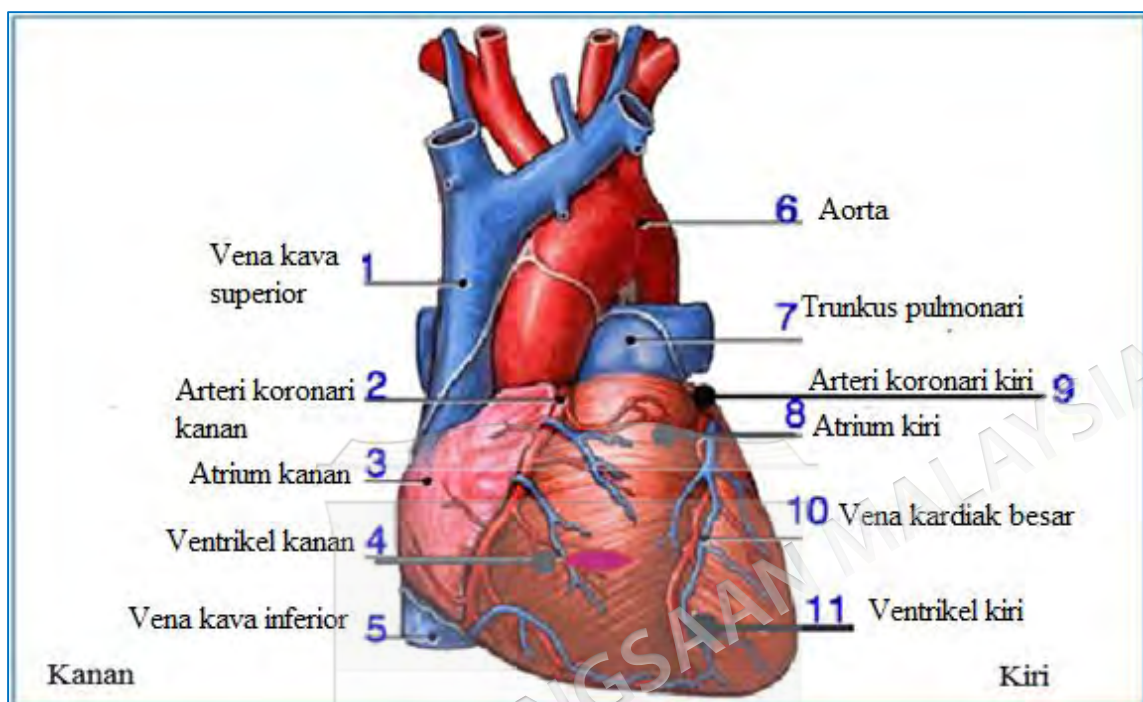
2.1 JANTUNG

2.1.1 Struktur Jantung

Jantung adalah organ yang berotot sebesar saiz genggam yang berfungsi sebagai pam untuk mengedar darah ke seluruh badan (Rajah 2.1). Dua per tiga daripada jisim jantung terdapat pada sebelah kiri badan dan satu per tiga di sebelah kanan (Marieb, 2013).

Jantung mengalirkan darah ke paru-paru melalui salur darah sebelum mengepam ke seluruh badan melalui arteri. Jantung terdiri daripada empat ruang. Atrium kanan dan kiri serta ventrikel kanan dan kiri adalah ruang jantung melalui mana darah dipam. Atrium adalah lebih kecil daripada ventrikel dan mempunyai dinding yang lebih nipis dan kurang berotot daripada ventrikel. Ventrikel adalah lebih besar, mengepam darah dengan lebih kuat lalu menghantar darah keluar dari jantung (Marieb, 2013). Jantung mempunyai empat injap yang mengawal laluan keluar di penghujung setiap ruang. Dua ruang atrium dan ventrikel dipisahkan oleh septum interatrial dan interventrikel masing-masing (Rajah 2.2). Dinding yang memisahkan ruang atrium dinamakan septum atrium manakala dinding yang memisahkan ruang ventrikel dinamakan septum ventrikel. Atrium dipisahkan daripada ventrikel melalui injap atrioventrikular. Atrium kanan menerima darah kembali daripada seluruh tubuh melalui vena kava superior dan inferior (Rajah 2.1). Ventrikel kanan yang menerima darah dari atrium kanan menghantarnya ke paru-paru melalui arteri pulmonari bagi pengoksigenan darah. Atrium kiri menerima darah beroksigen daripada paru-paru melalui vena pulmonari dan akhirnya darah masuk ke

ventrikel kiri. Dari ventrikel kiri darah dipam keluar daripada jantung melalui aorta untuk dihantar keseluruh tubuh ataupun peredaran sistemik.



Rajah 2.1: Pandangan Anterior Jantung Bahagian Eksterior

Sumber: Dipetik dan diubahsuai daripada Marieb & Hoehn, 2012

2.1.2 Perikardium

Jantung dilapisi oleh membran yang dikenali sebagai perikardium. Perikardium adalah sejenis membran serous yang menghasilkan cecair serous untuk melincirkan jantung. Selain itu, perikardium berfungsi untuk memastikan jantung berada dalam kedudukannya dan mengekalkan ruang kosong untuk jantung berkembang apabila ia penuh. Perikardium mempunyai dua lapisan iaitu lapisan viseral yang meliputi bahagian luar jantung dan lapisan parietal yang melapisi bahagian dalam jantung.

2.1.3 Struktur Dinding Jantung

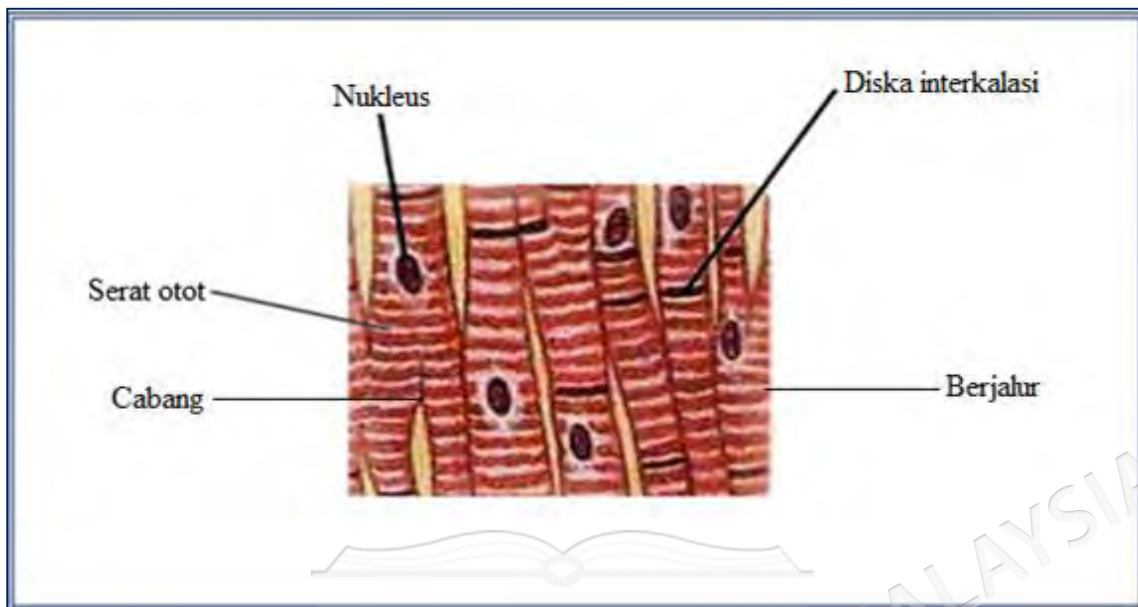
Dinding jantung terdiri daripada tiga lapisan iaitu epikardium yang merupakan lapisan paling luar, miokardium sebagai lapisan tengah dan endokardium yang merupakan

lapisan paling dalam. Dinding jantung terdiri daripada otot jantung, rangka berfiber dan sistem konduksi impuls jantung.

Perikardium: Epikardium adalah lapisan dinding jantung yang paling luar dan juga dikenali sebagai lapisan viseral perikardium. Lapisan epikardium terdiri daripada satu lapisan sel mesotelium yang dilapisi oleh membran dasar (Marieb & Hoehn, 2012). Salur darah dan saraf yang membekali jantung berada dalam lapisan epikardium ia dikelilingi oleh tisu adipos yang melindungi jantung dalam kaviti perikardium.

Miokardium: Miokardium adalah lapisan tengah jantung yang mengandungi tisu otot jantung yang merupakan komponen utama jantung. Miokardium memainkan peranan penting dalam pembentukan ketebalan dan jisim dinding jantung. Ia merupakan bahagian jantung yang bertanggung jawab untuk mengepam darah. Miokardium jantung pada ventrikel adalah lebih tebal daripada atrium. Profundus terhadap miokardium adalah lapisan endokardium yang nipis (Marieb & Hoehn, 2012).

Tisu otot jantung ini mempunyai ciri berjalur seperti tisu otot skelet dan ini boleh diperhatikan dalam hirisan histologi. Ia mempunyai jalur bercabang dan mempunyai diska interkalasi (*intercalated disks*) yang biasanya berwarna gelap dalam pewarnaan histologi. Diska interkalasi dan serat otot bercabang adalah ciri yang khusus bagi sel otot jantung (Rajah 2.2). Setiap sel otot jantung mempunyai panjang sekitar 100 um garis dengan bergaris pusat 15 μm , hujungnya yang sering terbelah dua atau lebih, dan mempunyai cabang yang melekat pada sel berdekatan atau bahagian dirinya pada diska interkalasi. Diska interkalasi ini merupakan persimpangan kompleks (Standring, 2010). Sarkoplasma otot jantung mengandungi banyak mitokondria, disekitar nukleus dan juga dalam rantai panjang yang disisipkan di antara miofilamen, yang di mana terdapat juga deposit glikoligen yang besar dan granul lipofusin. Sel-sel miokardium di atrium adalah lebih kecil berbanding ventrikel. (Marieb & Hoehn, 2012; Sherwood, 2012).

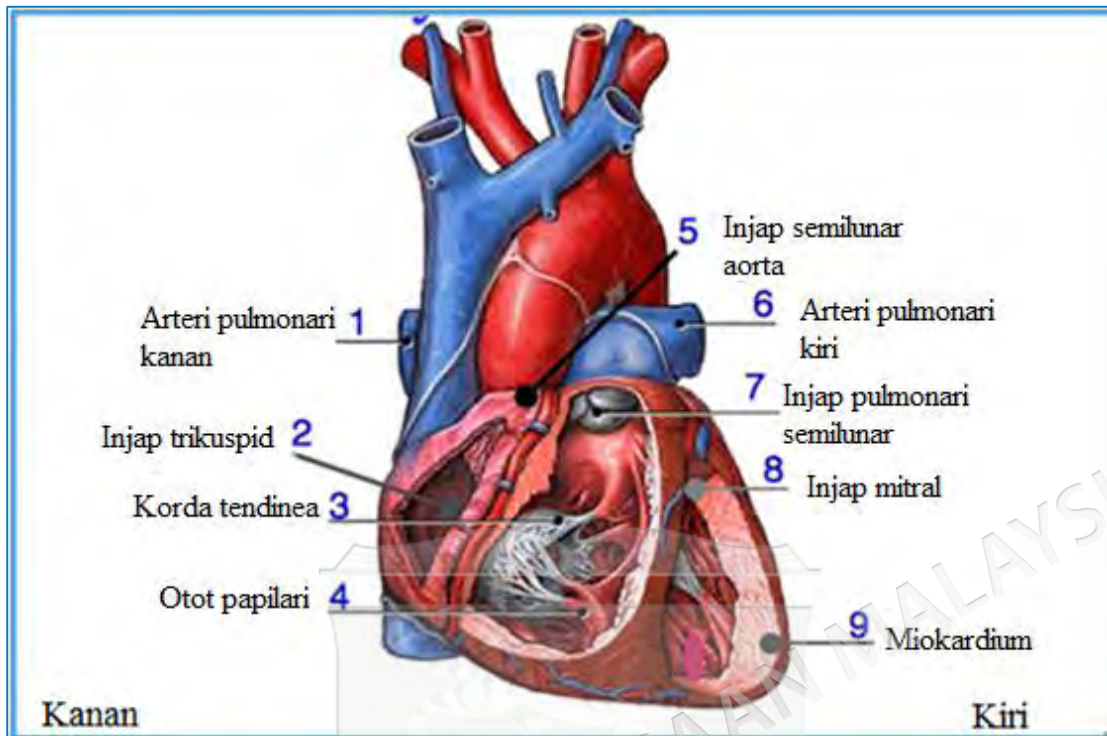


Rajah 2.2: Histologi Otot Jantung Keratan Memanjang

Sumber: Dipetik dan diubahsuai daripada Marieb & Hoehn, 2012

Endokardium: Lapisan endokardium merupakan lapisan paling dalam, terdiri daripada lapisan endothelium dan tisu pengantara subendotelium. Lapisan tengahnya terdiri daripada tisu pengantara dan sel otot licin serta lapisan tisu pengantara yang dikenali sebagai lapisan subendokardium. Lapisan subendokardium ini berterusan dengan tisu pengantara lapisan miokardium. Lapisan endokardium terdiri daripada sistem konduksi impuls. Endokardium adalah lapisan yang sangat licin dan bertanggung jawab untuk menghindari darah daripada melekat pada bahagian dalam jantung dan mengelakkan daripada gumpalan darah yang berbahaya (Marieb & Hoehn, 2012).

Ketebalan dinding jantung berbeza pada setiap bahagian di dalam jantung. Atria jantung mempunyai miokardium yang sangat nipis kerana ia hanya perlu mengepam darah ke ventrikel yang berdekatan (Rajah 2.3). Manakala, ventrikel mempunyai miokardium yang sangat tebal untuk mengepam darah ke seluruh badan (Frank et al. 2012). Ketebalan miokardium bahagian kanan jantung adalah kurang berbanding miokardium bahagian kiri. Hal ini kerana, bahagian kiri jantung digunakan untuk mengepam darah ke seluruh badan manakala bahagian kanan jantung hanya perlu mengepam darah ke paru-paru (Susan Standring, 2010; Marieb, 2013).



Rajah 2.3: Pandangan Anterior Jantung Bahagian Interior

Sumber: Dipetik dan diubahsuai daripada Marieb & Hoehn, 2012

2.2 TEKanan DARAH TINGGI

2.2.1 Tekanan Darah

Tekanan darah adalah tekanan atau daya tenaga yang dihasilkan oleh kontraksi pada salur darah bagi membantu jantung mengedarkan darah ke seluruh tubuh. Walaupun jantung dikatakan mengepam darah ke seluruh tubuh tetapi pada hakikatnya salur darah memainkan peranan dalam membantu mengalirkan darah ke seluruh tubuh dengan adanya tekanan darah. Tekanan darah boleh ditakrifkan sebagai jumlah tenaga yang dihasilkan oleh pengaliran darah ke atas dinding salur darah. Tekanan darah diukur dengan menggunakan alat yang dinamakan sfigmomanometer dan bacaannya diberi dalam unit millimeter merkuri (mmHg).

2.2.2 Sistolik dan Diastolik

Tekanan darah meningkat dalam arteri utama semasa ventrikular sistole dan tekanan darah menurun semasa ventrikular diastole. Ini membawa kepada dua keadaan yang dikaitkan dengan tekanan darah. Bacaan tekanan darah ini diberi dalam bentuk pecahan seperti 110/70 mmHg, iaitu tekanan darah sistolik (SBP) pada bahagian atas, 110 dan tekanan darah diastolik (DBP) di bawah 70.

Sistole: Tekanan darah yang paling tinggi semasa kontraksi ventrikel jantung (Sherwood, 2011).

Diastole: Tekanan darah paling rendah semasa relaksasi ventrikel jantung. Sel otot jantung akan mengendur atau relaks untuk membenarkan ruang jantung diisi dengan darah.

2.2.3 Klasifikasi Tekanan Darah

Beberapa organisasi dan pertubuhan kesihatan sedunia mengelaskan tekanan darah mengikut kategori yang hampir sama. Berdasarkan laporan *Joint National Committee (JNC) on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood pressure* yang ke-6 pada tahun 1997, tekanan darah normal diklasifikasikan di antara lingkungan 120-129/80-84 mmHg manakala tekanan darah normal yang tinggi diklasifikasikan di antara 130-139/85-89 mmHg. Klasifikasi ini adalah berdasarkan kepada bacaan tekanan darah sepenuhnya tanpa mempertimbangkan faktor risiko yang lain (Aguila et al. 2005).

Jadual 2.1 Klasifikasi tekanan darah

Kategori	Tekanan darah sistolik (mmHg)	Tekanan darah diastolic (mmHg)
Normal	<120	<80
Pra-hipertensi	120-139	80-89
Tekanan darah tinggi tahap 1	140-159	90-99
Tekanan darah tinggi tahap 2	≥ 160	≥ 100

Sumber: Dipetik dan diubahsuai daripada HHS (2004)

Tekanan darah tinggi kategori tahap 2 dan tahap 3 dalam klasifikasi JNC VI (1997) telah dimansuhkan dan dijadikan satu kategori sahaja iaitu klasifikasi tahap 2 yang disarankan oleh Jabatan Kesihatan dan Perkhidmatan Manusia Amerika Syarikat (*United States of Department of Health and Human Services, HHS (2004)*). Klasifikasi tekanan darah oleh HHS (2004) telah dihuraikan dalam Jadual 1 seperti yang dilaporkan oleh JNC, dan digunapakai dalam kajian ini.

2.2.4 Kitaran Jantung

Kitaran jantung termasuk semua aktiviti yang berlaku dalam satu denyutan jantung. Terdapat 3 fasa untuk kitaran jantung: sistole atrium, sistole ventrikel dan pengenduran.

Sistole atrium: Semasa fasa sistole atrium dalam kitaran jantung, atria akan mengecut dan menolak darah ke dalam ventrikel. Bagi memudahkan pengisian darah, injap AV akan kekal terbuka dan injap semilunar akan kekal tertutup untuk mengelakkan darah arterial daripada memasuki semula jantung. Atrium adalah jauh lebih kecil daripada ventrikel, oleh itu darah hanya akan mengisi kira-kira 25% daripada ventrikel semasa fasa ini. Ventrikel kekal dalam diastole semasa fasa ini (Sherwood, 2011).

Sistole ventrikel: Semasa ventrikular sistole, ventrikel akan mengecut untuk menolak darah ke dalam aorta dan trunkus pulmonari. Tekanan ventrikel akan memaksa injap semilunar untuk dibuka dan injap AV untuk ditutup. Susunan injap ini akan

mbolehkan pengaliran darah dari ventrikel ke dalam arteri berjalan dengan lebih lancar. Otot-otot jantung daripada atrium akan depolarisi dan kemudian bertukar kepada keadaan diastole semasa fasa ini (Frank et al. 2012).

Fasa Pengenduran: Semasa fasa pengenduran, kesemua 4 ruang jantung berada dalam keadaan diastole dan darah akan mengalir ke dalam jantung melalui salur darah. Ventrikel akan mengisi kapasiti kira-kira 75% semasa fasa ini dan sepenuhnya akan diisi hanya selepas atria mengalami sistolik. Sel otot jantung ventrikel akan mengalami depolarisi semasa fasa ini untuk bersedia bagi pusingan seterusnya iaitu penyahkutuban/depolarisasi dan pengecutan. Semasa fasa ini, injap AV akan terbuka untuk membolehkan darah mengalir bebas ke dalam ventrikel manakala injap semilunar yang berhampiran akan menghalang regurgitasi darah dari arteri yang besar ke dalam ventrikel (Sherwood, 2012).

2.2.5 Pengaliran Darah Melalui Jantung

Darah nyahoksigen dari badan akan memasuki jantung terlebih dahulu daripada vena kava superior dan inferior. Darah memasuki atrium kanan dan ianya akan dipam melalui injap trikuspid ke dalam ventrikel kanan. Dari ventrikel kanan, darah dipam melalui injap semilunar pulmonari ke dalam trunkus pulmonari. Trunkus pulmonari membawa darah ke paru-paru di mana ianya akan mengeluarkan karbon dioksida dan kemudian menyerap oksigen. Darah dari paru-paru mengalir ke jantung melalui vena pulmonari dan masuk semula ke atrium kiri (Frank et al. 2012).

Atrium kiri akan mengecut untuk mengepam darah melalui injap bikuspid (mitral) ke dalam ventrikel kiri. Ventrikel kiri mengepam darah melalui injap semilunar aortik ke dalam aorta. Seterusnya, darah memasuki ke dalam peredaran darah sistemik melalui seluruh tisu badan sehingga ia kembali ke jantung melalui vena kava dan kitaran ini akan sentiasa berulang (Frank et al. 2012).

2.3 PENYAKIT KARDIOVASKULAR

Sistem kardiovaskular terdiri daripada jantung, saluran darah dan darah. Penyakit kardiovaskular (CVD) adalah istilah umum yang menerangkan penyakit jantung atau saluran darah. Aliran darah ke jantung, otak atau badan akan berkurangan akibat darah beku, atau pengumpulan lemak di dalam arteri yang menyebabkan arteri menjadi keras dan sempit (Sherwood, 2011). Menurut Li (2006), pengawalan tekanan darah tinggi adalah satu perkara penting dalam pengawalan penyakit kardiovaskular. Ini berdasarkan kepada kajiannya yang mencadangkan bahawa tekanan darah tinggi merupakan faktor risiko utama penyakit kardiovaskular, kegagalan buah pinggang dan strok. Sebelum ini, faktor yang menyebabkan tekanan darah tinggi dikatakan mempunyai sifat pelbagai faktor di mana antaranya faktor genetik dan persekitaran. Terkini satu kumpulan penyelidik telah menunjukkan bahawa inflamasi vaskular mungkin terlibat dalam permulaan dan progresi tekanan darah tinggi (Teran et al 2000; Grundy et al. 2003; Sesso et al. 2003; Li et al 2005). Satu lagi hasil kajian telah mencadangkan bahawa inflamasi dinding vaskular memainkan peranan utama dalam patogenesis dan progressi aterosklerosis, penyakit kardiovaskular dan tekanan darah tinggi (Braiser et al. 2002; Touyz et al. 2004).

2.3.1 Epidemiologi Penyakit Kardiovaskular (WHO, 2015)

- a. Penyakit kardiovaskular adalah punca utama kematian di seluruh dunia; lebih ramai orang mati setiap tahun disebabkan oleh penyakit kardiovaskular daripada faktor risiko yang berlainan.
- b. Dianggarkan 17.5 juta orang mati akibat penyakit kardiovaskular pada tahun 2020, yang mewakili 31% daripada semua kematian global. Kematian ini, dianggarkan 7.4 juta adalah disebabkan oleh penyakit jantung koronari dan 6.7 juta adalah disebabkan oleh strok.
- c. Lebih tiga suku daripada kematian penyakit kardiovaskular berlaku di negara-negara berpendapatan rendah dan sederhana.

- d. Daripada 16 juta kematian di bawah umur 70 akibat penyakit tidak berjangkit, 82% di negara-negara berpendapatan rendah dan sederhana dan 37% adalah disebabkan oleh penyakit kardiovaskular.
- e. Kebanyakan penyakit kardiovaskular boleh dicegah dengan menangani faktor risiko tingkah laku seperti merokok, pengambilan diet yang tidak sihat, obesiti, aktiviti fizikal yang pasif dan pengambilan alkohol.
- f. Individu yang mempunyai penyakit kardiovaskular atau berisiko tinggi mendapat penyakit tersebut (kerana kehadiran satu atau lebih faktor risiko seperti tekanan darah tinggi, kencing manis, hiperlipidemia) memerlukan pengesanan awal dan pengurusan menggunakan kaunseling dan ubat-ubatan, mengikut kesesuaian dan nasihat doktor.

2.3.2 Jenis-Jenis Penyakit Kardiovaskular (CVD)

Terdapat empat jenis utama CVD.

- a) Penyakit jantung koronari
- b) Strok
- c) Penyakit periferi arteri
- d) Penyakit Aorta

Penyakit kardiovaskular yang lain termasuk: penyakit iskemia jantung (IHD), penyakit jantung hipertensi, penyakit jantung reumatik (RHD), aneurisma aorta, kardiomiopati, fibrilasi atrium, penyakit jantung kongenital dan endokarditis (Lauralee Sherwood, 2012).

- a) Penyakit jantung koronari : penyakit jantung koronari (CHD) berlaku apabila aliran darah yang kaya dengan oksigen ke jantung tersumbat atau dikurangkan oleh pengumpulan bahan lemak (ateroma) dalam arteri koronari. Arteri koronari adalah dua saluran darah utama yang membekalkan darah kepada jantung. Oleh hal yang demikian, saluran darah mengecil kerana pengumpulan ateroma, bekalan darah ke jantung akan tersekat dan perlahan. Keadaan ini boleh menyebabkan angina (sakit dada). Jika arteri koronari menjadi tersumbat sepenuhnya, ia boleh menyebabkan serangan jantung (Sherwood, 2012).

- b) Strok : Strok adalah suatu keadaan perubatan yang serius yang berlaku apabila bekalan darah ke bahagian otak terputus. Seperti semua organ, otak memerlukan bekalan oksigen yang berterusan dan nutrien untuk berfungsi dengan betul. Oleh itu jika aliran darah terhad atau berhenti, sel otak akan mula mati. Hal ini boleh menyebabkan kerosakan otak dan kemungkinan kematian. Oleh itu, strok memerlukan perubatan kecemasan dan rawatan segera adalah penting. Lebih cepat seseorang individu yang mengalami strok menerima rawatan, lebih kurang kerosakan yang mungkin berlaku (Sherwood, 2011).
- c) Penyakit arteri periferi: penyakit arteri periferi, juga dikenali sebagai penyakit vaskular periferi, berlaku apabila ada penyumbatan dalam arteri, kebiasaannya ke bahagian kaki. Simptom yang paling biasa adalah sakit di kaki ketika berjalan. Hal ini biasanya dalam satu bahagian atau kedua-dua bahagian paha, pinggul atau betis. Kesakitan yang dirasakan pesakit adalah seperti kekejangan atau rasa berat di dalam otot kaki. Gejala ini biasanya datang dan pergi, dan menjadi lebih teruk semasa aktiviti-aktiviti yang menggunakan kaki seperti berjalan atau menaiki tangga (Frostegard et al., 1999).
- d) Penyakit aorta: Aorta adalah salur darah terbesar di dalam badan. Ia membawa darah dari jantung ke seluruh badan. Antara penyakit aorta yang biasa dihadapi individu adalah aneurisma aortik, di mana dinding aorta menjadi lemah dan membonjol ke arah luar. Pesakit akan mengalami sakit di dada, belakang atau abdomen (Sherwood, 2011).

2.3.3 Faktor-Faktor Risiko bagi Penyakit Kardiovaskular

Terdapat beberapa faktor risiko bagi CVD, termasuk: tekanan darah tinggi, merokok, serum kolesterol yang tinggi, kencing manis, pengambilan alkohol berlebihan, kurang bersenam, berat badan berlebihan atau obes, mempunyai sejarah keluarga berpenyakit jantung, latar belakang etnik dan stres (Gimbrone et al. 2000; Zitvogel et al. 2010; Campbell et al. 2012; Morton & Perry, 2013)

2.4 MINYAK KELAPA SAWIT DAN KEGUNAANNYA

Minyak kelapa sawit merupakan minyak paling utama yang digunakan secara global iaitu 49.05 juta tan setahun (USDA, 2012). Di Malaysia, minyak kelapa sawit menjadi pilihan orang ramai kerana ianya lebih murah dan mudah didapati di pasaran Malaysia (Klurfeld, 1991; Azman et al. 2010). Purata penghasilan minyak kelapa sawit dunia setahun adalah 4.14 tan per hektar yang mana Malaysia merupakan salah satu negara pengeluar minyak kelapa sawit utama dunia. Walaupun Malaysia merupakan salah satu penghasil dan pengeksport utama minyak kelapa sawit dunia, ia masih memberi bekalan yang cukup kepada penduduk negaranya (Barison, 2007).

Minyak kelapa sawit merupakan salah satu jenis minyak sayuran yang diperolehi daripada tumbuhan tropika iaitu pokok kelapa sawit, *Elaeis guineensis*. Minyak ini dihasilkan dengan menggunakan bahagian mesokarp buah kelapa sawit. Bahagian buah kelapa sawit ini boleh menghasilkan sebanyak 45-55% (Edem, 2012) daripada jumlah minyak yang dihasilkan daripada seluruh buah kelapa sawit. Minyak kelapa sawit yang diesktrak daripada mesokarp digunakan dalam penghasilan berbagai jenis produk makanan seperti minyak masak, marjerin dan lemak sayuran yang lain (Rajah 2.4). Manakala ekstrak minyak yang berbentuk mentah daripada bahagian kernelnya pula digunakan bagi menghasilkan bahan bukan makanan seperti sabun, lilin, kosmetik dan bahan pencuci. Mengikut hasil kajian Edem (2002) 90% minyak kelapa sawit digunakan bagi tujuan menghasilkan barang makanan dan hanya 10% untuk menghasilkan sabun dan pemprosesan oleokimia seperti asid lemak, metal ester dan lain-lain lagi (Goh & Gee, 2006).

Minyak kelapa sawit terdiri daripada dua kandungan yang dibahagikan kepada kandungan major dan kandungan minor. Trigliserida membentuk komponen majornya bersama digliserida dan monogliserida, manakala komponen minorinya terdiri daripada asid lemak bebas dan *phytonutrients*. Ciri-ciri kimia minyak sawit, asid lemak, kandungan tokoferol dan kandungan karotenoid diberikan seperti dalam jadual 2.2 dan 2.3.



Rajah 2.4: Kegunaan Kelapa Sawit Dalam Industri Makanan

Sumber : Dipetik dan diubahsuai daripada Edem, 2012

Jadual 2.2 Kandungan Asid Lemak Di Dalam Minyak Sawit

Ciri-Ciri Kimia Minyak Sawit Merah

Asid Lemak	%
Miristik (14:0)	0.8
Palmitik (16:0)	42.0
Stearik (18:0)	5.1
Oleik (18:1)	42.0
Linolik (18:2)	10.0
Jumlah karotene	550
Beta-karotene	68.2
Tokoferol dan tokotrienol (ng/L)	468

Sumber: Dipetik dan diubahsuai daripada David Kritchevsky (2002)

Jadual 2.3 Kandungan Karotenoid Dan Tokoferol Di Dalam Minyak Sawit

	Minyak sawit	Minyak sawit merah	Bancuhan minyak sawit
Karotenoid (p.p.m)	1.3	706.1	781.3
Vitamin E (p.p.m)	-	-	-
α -Tokoferol	158.3	161.9	266.3
α -Tokotrienol	155.1	197.9	267.6
β -Tokotrienol	-	-	-
γ -Tokotrienol	223.5	284.5	337.3
δ -Tokotrienol	49.8	69.4	972.4
Jumlah (p.p.m)	0.47	0.57	0.53

Sumber: Dipetik dan diubahsuai daripada David Kritchevsky (2002)

Minyak sawit mentah mengandungi ubiquinone. Sebatian ini berkaitan dengan vitamin K dan mempunyai sifat antioksidan (Hazura & Choo, 2006). Audley (2006) mendapati minyak sawit mentah mengandungi beberapa sebatian fenolik neutral dan berasid. Kebanyakan sebatian ini mempunyai antioksidan yang berhubung. Sebahagian besar daripada sebatian ini kekal dalam minyak selepas penapisan. Minyak sawit yang ditapis mengandungi karotenoid dan prekursor vitamin A yang sangat tinggi (Jadual 2.3).

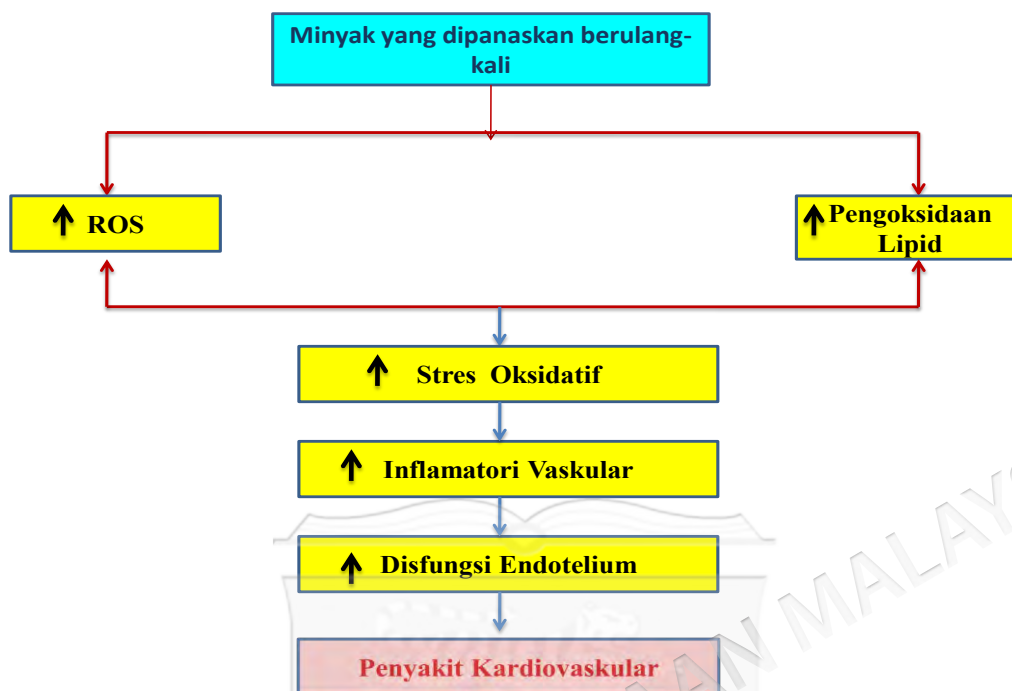
2.4.1 Kesan Pemanasan terhadap Minyak Kelapa Sawit

Dalam proses penyediaan makanan domestik atau perindustrian, teknik penggorengan adalah menjadi satu lumrah. Ia juga merupakan salah satu cara masakan tradisional dan popular di kalangan masyarakat global (Choe & Min, 2007). Ia kerap dijalankan dalam suhu 140-200⁰C (Kochhar & Gertz, 2004). Minyak memainkan peranan sebagai media pemindah haba di samping menyumbang kepada rasa, warna dan tekstur yang ranggup pada makanan yang digoreng lalu menjadikan ia popular di kalangan pengguna (Boskou et al. 2006). Menggoreng adalah satu proses yang sangat kompleks dengan tindak balas

fizikal dan kimia. Tindak balas kimia adalah degradasi haba, pengoksidaan, dan pempolimeran asid lemak yang membawa kepada rasa yang kurang enak. Bahan toksik dalam minyak yang dipanaskan berulang kali menyebabkan keracunan makanan dan kehilangan vitamin asal daripada makanan (Paul & Mittal, 1997). Pada suhu yang tinggi, kolesterol makanan haiwan akan terdedah kepada proses auto-oksidaan dengan kehadiran molekul oksigen, cahaya dan suhu yang tinggi. Ini menyebabkan berlakunya tindak balas radikal bebas dan pengoksidaan lipid.(Rajah 2.5).

Salah satu punca pengoksidaan lipid adalah akibat daripada proses pemanasan minyak makanan berulang kali dengan jangka masa yang panjang di bawah suhu yang tinggi. Lipid dikategorikan sebagai trigliserida, fosfolipid dan sterol, yang akan mengalami pengoksidaan kerana terdapat molekul oksigen dalam udara alam sekitar. Bahan makanan yang mengandungi asid lemak tak tepu adalah sangat mudah terdedah kepada pengoksidaan lipid. Semakin tinggi tahap asid lemak tidak tepu, semakin mudah makanan tersebut terdedah kepada pengoksidaan (Hidalgo et al. 2005). Hidroperoksida, diakil peroksida serta spesies oksigen reaktif lain merupakan produk hasil daripada pengoksidaan lipid yang boleh mencetuskan inflamasi. Pengoksidaan lipid dan spesies oksigen reaktif mendatangkan kesan buruk yang memudaratkan terhadap fungsi sistem kardiovaskular lalu membawa kepada penyakit kardivaskular seperti obesiti dan peningkatan tekanan darah (Azman et al.2010)

Pengoksidaan lipid berlaku secara meluas dalam makanan dengan menghasilkan oksigen bebas radikal dan spesies oksigen reaktif (ROS). Radikal bebas (ROS) ditakrifkan sebagai molekul kimia reaktif yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. ROS yang mengandungi atom oksigen dipanggil sebagai oksigen radikal bebas (Heim et al. 2002).



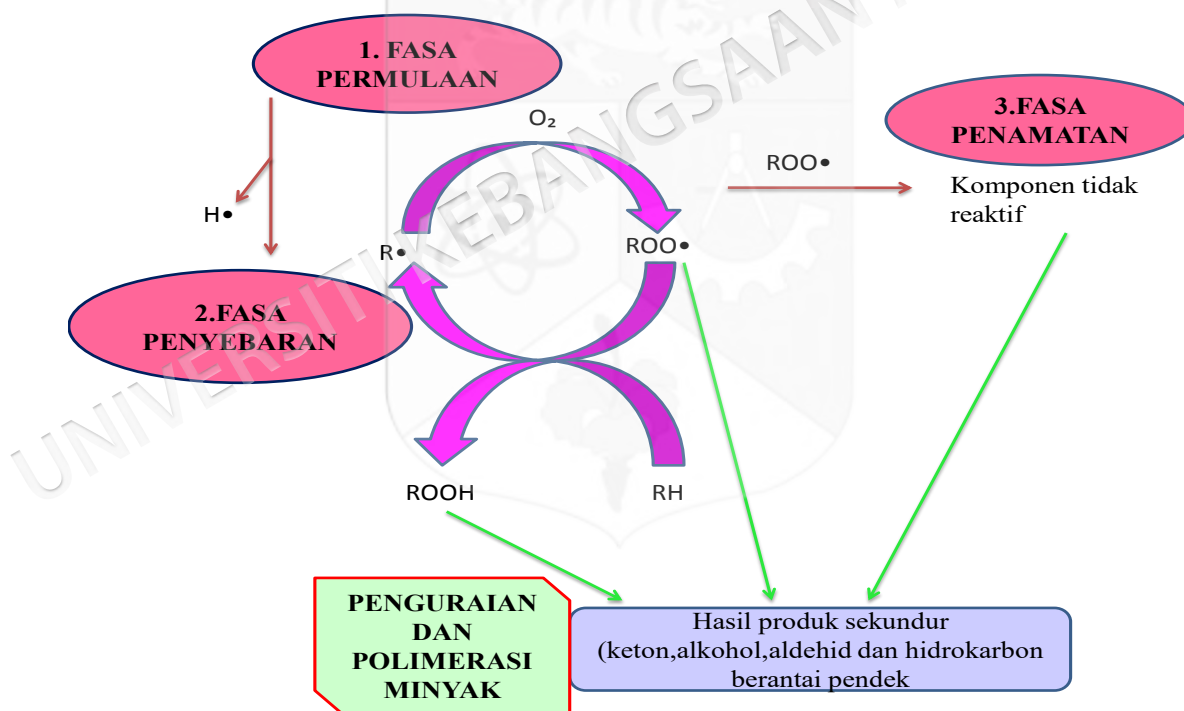
Rajah 2.5 :Kesan minyak yang dipanaskan berulang kali

Sumber: Dipetik dan diubahsuai daripada Kochhar & Gertz (2004)

Menurut Min dan Boff dalam kajiannya (2002), proses pengoksidaan lipid terdiri daripada tiga fasa (Rajah 2.6). Dalam fasa pertama, ROS dan haba yang dihasilkan semasa pemanasan minyak akan memutuskan ikatan antara karbon-hidrogen (C-H) dengan ikatan berganda asid lemak dan kemudian menghasilkan spesies radikal lipid dan ia dipanggil sebagai radikal alkil ($R\bullet$) (Rajah 2.6). Seterusnya, fasa kedua yang dikenali sebagai fasa penyebaran radikal alkil bertindak balas dengan oksigen di-radikal berganda tiga dengan cepat lalu menghasilkan radikal peroksil ($ROO\bullet$) (Rajah 2.6) dan menjadikan radikal alkil tidak stabil. Setelah itu, radikal peroksil akan memutuskan ikatan karbon-hidrogen asid lemak yang lain lalu membentuk radikal alkil yang baru bersama dengan hidroperoksida ($ROOH$). Rangkaian ini terus berulang dan digelar rantai tindakbalas radikal bebas. Justeru itu, dengan peningkatan kepekatan radikal bebas dan kadar pengulangan tindakbalas tersebut, maka peluang pelanggaran di antara radikal juga semakin meningkat semasa fasa penamatan. Pada akhir fasa penamatan, ikatan antara

dua radikal akan menghasilkan kompaun tidak reaktif, menjadikan rantai tidakbalas radikal bebas tamat (Petron et al., 2003).

Choe dan Min (2006,2007) mencadangkan ikatan oksigen hidroperoksida tidak stabil pada suhu yang tinggi lalu akan terurai dan menghasilkan produk seperti keton, alcohol, aldehid dan hidrokarbon berantai pendek. Pengoksidaan terma juga memusnahkan bau aroma warna dan nutrisi minyak masak yang dipanaskan. Proses pengoksidaan dihuraikan dengan ringkas dalam Rajah 2.6. Di samping, penghasilan produk pengoksidaan lipid dalam proses pemanasan minyak kelapa sawit, paras vitamin E iaitu tokoferol dan tokotrienol yang mempunyai sifat antioksidan merosot dengan signifikannya. Kadar kemerosotan vitamin E berkadar langsung dengan kadar pemanasan minyak tersebut (Du et al. 2001; Adam et al.2007).



Rajah 2.6: Mekanisme Pengoksidaan Lipid

Petunjuk : O_2 ; Oksigen , $H\bullet$; Radikal hidrogen , $ROO\bullet$; Radikal peroksil, $R\bullet$; Radikal alkil, $ROOH$; Hidroperoksida, RH ; Asid lemak

Sumber: dipetik dan diubahsuai daripada Choe & Min (2007) ; Adam et al. (2007)

2.4.2 Pengoksidaan Kolesterol dalam Makanan yang Digoreng

Kebelakangan ini, kepentingan khusus telah ditunjukkan dalam bidang kimia, toksikologi untuk mengetahui lebih lanjut ciri biologi produk pengoksidaan kolesterol (COP), kerana COP terdapat dalam sesetengah makanan yang diproses seperti telur, kentang goreng dan makanan yang diproses lain diambil sebagai diet harian (Du et al.2001; Petron et al. 2003). Aktiviti biologi COP dikaitkan dengan risiko kesihatan manusia (Valenzuela et al. 2002).

Produk kolesterol teroksida dalam diet diserap ke dalam sistem peredaran dan tisu serta organ. Petron et al. (2003) melaporkan bahawa cholest-5-ene-3, 25-diol, salah satu daripada COP, diserap, diangkut dan dimasukkan ke dalam tisu vaskular dengan lipoprotein ketumpatan rendah (LDL) yang telah diperhatikan dalam eksperimen melibatkan monyet. Kuantiti oksida dalam diet telah dikaitkan dengan kepekannya dalam serum haiwan dan manusia (Plat et al. 2000). Hal ini juga menunjukkan bahawa COP mempercepatkan pembangunan aterosklerosis dalam arnab (Valenzuela et al. 2002).

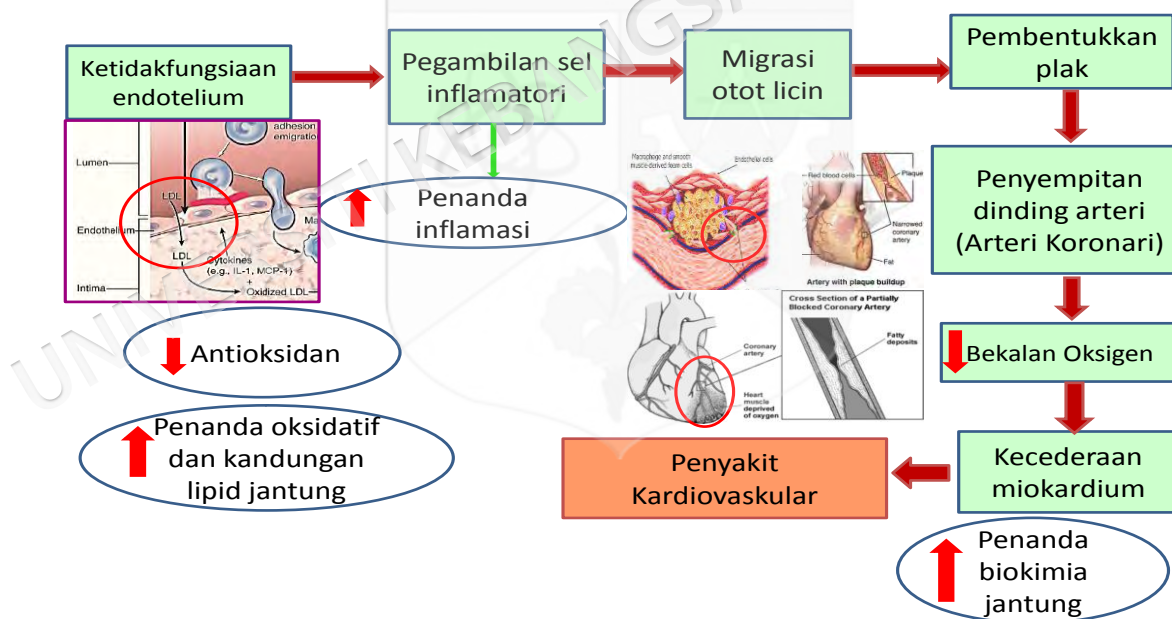
Sebahagian daripada COP mendorong kepada kerosakan arteri dan 5, 6 α -epoxy-5 β -cholestane-3 β -diol (satu COP) disyaki mempunyai risiko yang tinggi kerana kandungan karsinogennya (Paniangvait et al. 1995). Selain itu, beberapa produk pengoksidaan kolesterol adalah aterogenik, sitotoksik, mutagenik, dan juga berkemungkinan merupakan ejen karsinogenik (Morin et al. 2001). Dalam proses pengoksidaan kolesterol, produk utama yang dihasil adalah hidroperoksida kimia. Hasil kajian menunjukkan bahawa dengan peningkatan haba, pH yang melampau, cahaya, oksigen, pemangkin dan kehadiran asid lemak politaktepu adalah faktor utama mendorong pembentukan COP dalam makanan yang digoreng.(Subagio & Morita, 2001). Justeru, menjadi keutamaan untuk manusia berusaha mencegah atau mengelakkan pembentukan COP semasa pemrosesan dan penyimpanan makanan yang mengandungi lipid (Du et al. 2001).

2.4.3 Patogenesis Penyakit Kardiovaskular

Nutrisi pemakanan dan pengambilan kolesterol dalam diet telah dibuktikan tersenarai sebagai faktor risiko tertinggi dalam CVD (Guido & Isabelle, 2004). Bukti terkumpul

menunjukkan bahawa pembentukan plak dikaitkan dengan penghasilan spesies oksigen reaktif, yang kini dilaporkan mendorong kepada kerosakan tisu oksidatif (Lusis, 2000) pada dinding arteri justeru menyebabkan penyakit kardiovaskular (Rajah 2.7).

Amalan menggunakan minyak yang telah dipanaskan dan digoreng adalah perkara biasa dalam proses penyediaan makanan. Manakala, minyak kelapa sawit merupakan minyak sayuran yang paling biasa digunakan di Malaysia (Azman et al. 2012). Walau bagaimanapun, proses pemanasan akan menyebabkan perubahan dalam komposisi minyak sawit. Minyak yang dipanaskan berulang kali akan mengalami perubahan sifat-sifat fizikal dan berlaku siri tindak balas kimia seperti pengoksidaan, hidrolisis dan pemolimeran yang akhirnya mengubah komposisi asid lemak (Choe & Min, 2007). Oleh itu, apabila tahap tidak tepu dalam asid lemak lebih tinggi, akan menyebabkan ia lebih berisiko untuk terdedah kepada peroksidaan lipid (Choe & Min, 2007).



Rajah 2.7: Patogenesis Penyakit Kardiovaskular

Sumber: Dipetik dan diubahsuai daripada Lusis (2000); Vincent (2001); & Thygesen (2007)

TBARS adalah salah satu daripada produk akhir utama peroksidaan lipid terutamanya peroksidaan asid lemak poli tidak tepu yang menyebabkan kerosakan endotelial, keradangan vaskular dan kecederaan sel membran (*World Vegetable & Marine oil Consumption*, 2007). Minyak sawit yang dipanaskan terbukti akan menghasilkan nilai peroksida yang lebih tinggi (Harrison et al. 2007; Ng et al. 2012; Leong et al. 2010) dan peningkatan dalam paras plasma MDA (Leong et al. 2010). Peroksidaan lipid digunakan untuk memantau tekanan oksidatif di dalam sel dan tisu. Ia adalah cara yang paling baik untuk menggambarkan kecederaan sel (Leong et al. 2010). MDA biasanya diukur sebagai penanda untuk tahap peroksidasi lipid. TBAR adalah kaedah yang paling biasa dan kerap digunakan untuk mengukur MDA.

Pengumpulan lipid jantung dikaitkan dengan kemerosotan fungsi jantung (Bilet et al. 2011). Terdapat pandangan dan cadangan bahawa peningkatan kepekatan plasma asid lemak (FA) adalah penyebab kepada pengumpulan lipid jantung. Obesiti pula dikaitkan dengan penyimpanan lipid berlebihan (trigliserida) bukan sahaja dalam tisu adipos tetapi juga dalam otot rangka, hati dan jantung. Pengumpulan lipid dalam tisu jantung dikatakan mungkin mempunyai kesan lipotoksik. Ini menjejaskan fungsi jantung dan menjadi cenderung untuk kejadian kardiomiopati dan kegagalan jantung. Terdapat banyak kajian yang menunjukkan bahawa pengumpulan lipid jantung makin bertambah dengan meningkatnya kepekatan FA yang bersirkulasi dalam tubuh. Sebagai contoh, obesiti (Kankaanpaa et al. 2006), diet berkalori tinggi, pengambilan makanan bergoreng yang berlebihan menggunakan minyak masak yang menyebabkan kesan lipotoksik (Van der Meer et al. 2007). Kepekatan FA yang beredar dalam badan didapati berhubungkait dengan kandungan lipid jantung (Kankaanpaa et al. 2006).

Penentuan troponin jantung dan kepekatan LDH dalam serum atau plasma untuk mendiagnosis dan memantau kecederaan jantung merupakan kaedah yang diterima pakai untuk dilakukan ke atas haiwan dan juga dalam bidang perubatan manusia (Adin et al. 2006; O'Brien, 2006; Eugene Herman et al. 2014). Walaupun ia dianggap digunakan secara berleluasa untuk mendiagnosis sindrom koronari akut dan infarksi miokardium (Antman et al. 2000), namun cara penentuan protein globular intrasel ini yang dibebaskan sebagai miosit jantung yang tercedera telah terbukti banyak membantu dalam diagnosis kecederaan jantung disebabkan oleh pelbagai faktor (O'Brien, 2006). Troponin jantung

dan kepekatan LDH telah dikenalpasti sebagai penanda bio keselamatan translasi yang paling berkesan untuk mengenalpasti kecederaan kardiotoxik di mana kecederaan tersebut menyebabkan gangguan integriti sel membran jantung (O'Brien, 2008). Penentuan kepekatan troponin sebagai penanda untuk mengesan kecederaan jantung dalam ujian klinikal manusia disokong oleh “*European Society American College of Cardiology*” (Thygesen et al. 2007).

SOD dan CAT adalah dua enzim pemusnah yang menghapuskan radikal bebas toksik (Ganesan Kumar et al. 2008; Wohaieb & Godin, 1987). Dalam sistem pertahanan antioksidan enzim, SOD adalah antara salah satu enzim yang paling penting dan merupakan pemusnah anion O_2^- (yang merupakan produk pertama radikal O_2) untuk membentuk H_2O_2 lantas dapat mengurangkan kesan toksik yang disebabkan oleh radikal atau radikal bebas lain hasil daripada tindakbalas peringkat kedua (Arunabh et al. 1999). Anion O_2^- dikenalpasti untuk menyahaktif CAT (Halliwell & Gutteridge 1984).

CAT dianggap sebagai penentu utama status antioksidan hati dan jantung (Wohaieb & Godin 1987). Ianya diketahui terlibat dalam detoksifikasi kepekatan H_2O_2 (Yoshikawa et al. 1993, Manonmani et al. 2002). Aktiviti enzim ini telah dilemahkan oleh ROS dalam penghidapan penyakit diabetes dan kardiovaskular (Ahmed et al. 2000). Pengurangan kepekatan GSH dalam darah juga menunjukkan ciri tekanan oksidatif. Peningkatan kepekatan GSH dalam tisu jantung pada tikus obes adalah contoh tindak balas kepada pembentukan radikal bebas dalam usaha untuk melindungi sel daripada kerosakan oksidatif (Vincent et al., 2001).

Terdapat banyak kajian yang menunjukkan bahawa pesakit dengan kegagalan jantung kronik mempunyai peningkatan tahap peredaran faktor- α nekrosis tumor (TNF- α), seperti penyakit jantung iskemia yang memburukkan lagi kardiomiopati (Matsumori et al. 1994; Torre-Amione et al. 1996). Hipertrofi ataupun pembesaran abnormal sel otot jantung merupakan ciri utama penyakit berkaitan jantung (Gilbert et al, 1994; Beltrami et al. 1994). TNF- α dianggap sebagai faktor penting yang boleh mendorong kepada hipertrofi. Malah, kesan langsung daripada faktor tersebut terhadap hipertrofi jantung dapat dilihat dalam sel otot jantung yang dikultur. TNF- α terbabit dalam perantaraan oksigen reaktif (ROI). TNF- α menjalankan aktiviti sitotoksik pada sesetengah jenis sel tumor dan sebahagiannya melalui penjaanaan ROI (Goossens et al., 1995).

Tekanan darah tinggi merupakan salah satu daripada faktor risiko utama penyakit kardiovaskular. Keadaan ini telah menyumbang kepada punca utama kematian di negara maju dan membangun (Lopez et al. 2006; Yadav et al. 2008; Danaei et al. 2009; WHO, 2009). Tekanan darah tinggi telah dianggap mempunyai kaitan dengan ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan dan ROS (Romero-Alvira & Roche, 2006; Kashyap et al. 2005; Patil et al. 2008.).

Peningkatan tahap penanda keradangan, terutamanya tahap CRP, dikaitkan dengan peningkatan risiko penyakit kardiovaskular (Biasucci et al. 2000; Ridke et al. 2003; Ridker et al. 2000). Serum CRP merangsang ungkapan sel endotelium dalam bentuk (ICAM-1) dan (VCAM-1) (Pasceri et al. 2000; Torzewski et al. 2000). Pelbagai kajian menunjukkan terdapat banyak penanda keradangan yang boleh meramal aktiviti kardiovaskular, termasuk molekul sel lekatan, sitokin, kemokin, tindak balas fasa akut seperti fibrinogen, serum amiloid A dan CRP.

Kebelakangan ini, CRP muncul sebagai salah satu daripada pengantara keradangan paling penting. Ia berkemampuan untuk terlibat secara terus dalam patogenesis aterosklerosis dengan mengaktifkan sel endotelial dan menyebabkan inflamasi komponen aterosklerosis (Verma et al. 2003; Szmítko et al. 2003). CRP memainkan peranan penting dalam patogenesis proses keradangan vaskular yang dimansuhkan oleh terapi simvastatin.

Salah satu cara terbaik untuk mengelakkan penyakit jantung koronari dalam masyarakat adalah dengan mengubah tabiat pemakanan, termasuk mengurangkan pengambilan lemak tepu haiwan. Terdapat banyak jenis minyak sayuran di pasaran, seperti kelapa, zaitun dan soya, yang dicadangkan untuk kegunaan manusia kerana kandungan tinggi asid lemak monotaktepu (MUFA) dan PUFA (Chahoud et al. 2004). Selain itu, minyak soya diketahui dapat membantu pelbagai tindak balas antioksidan terhadap peroksidaan lipid dengan kandungan tokoferolnya yang tinggi (Warner, 2006).

2.5 ANTIOKSIDAN SEMULAJADI DALAM SUMBER TUMBUHAN

Antioksidan merujuk kepada bahan yang wujud pada kepekatan yang rendah dalam makanan dan dapat menghalang pengoksidaan yang disebabkan oleh pro-oksidaan dengan ketara termasuklah pengoksidaan lipid. Pro-oksidaan, yang dianggap sinonim dengan spesies oksigen reaktif, merujuk kepada bahan yang boleh menyebabkan atau menggalakkan tindakbalas oksidatif. Antioksidan boleh memainkan peranan dalam antioksidasi sebagai pemusnah radikal bebas, ejen penurunan, ejen pengelat dan pemusnah singlet oksigen. Terdapat pelbagai antioksidan sintetik telah didaftarkan, tetapi hanya beberapa spesies sahaja yang dibenarkan sebagai bahan tambahan makanan oleh undang-undang kerana kesan keracunan dan kesan sampingan yang lain. Antara antioksidan biasa yang dibenarkan sebagai bahan tambahan makanan ialah *butylated anisole hydroxy* (BHA), *butylated toluene hydroxy* (BHT), *pueraria glycoside* (PG), dan *butylatedhydroquinone* (TBHQ) ketiga.

Baru-baru ini, kebimbangan masyarakat tentang masalah kesihatan yang disebabkan oleh bahan tambahan makanan sekali lagi telah mencetuskan semangat kepada saintis pemakanan untuk mencari antioksidan semula jadi dari pelbagai sumber. Sehingga sekarang, salah satu daripada pemahaman mengenai isu ini ialah antioksidan semulajadi adalah sebatian tumbuhan fenolik utama yang terdapat pada semua bahagian tumbuhan. Antioksidan fenolik yang biasa didapati daripada sumber tumbuhan termasuklah sebatian flavonoid, derivatif asid sinamik, kumarin, tokoferol, karotenoid dan asid organik polifungsi (Shahidi & Wansaundara, 2002).

2.5.1 Tokoferol

Tokoferol sebagai sebatian mono-fenolik telah digunakan dalam industri makanan selama beberapa dekad oleh kerana fungsinya dalam mencegah pengoksidaan asid lemak poli tidak tepu dalam makanan yang mengandungi lemak atau minyak (Khan & Shahidi, 2001). Tokoferol ditambah ke dalam minyak masak ketika penyimpanan, pemrosesan dan penghantaran minyak. Tokoferol boleh didapati dengan kuantiti yang tinggi dalam pelbagai sumber segar tumbuhan tipikal termasuk minyak sayuran, bijirin dan kacang

seperti bijan, beras, jagung, dan kacang soya. Mekanisme antioksidasi oleh tokoferol adalah dengan menukarkan hidrogen fenolik kepada molekul radikal dan pemusnah singlet oksigen (Min & Lee, 2009). Mekanisme ini diuraikan oleh asas sistem redoks tokoferol-tokoferil kuinina.

Tokoferol (AH_2) sebagai pengurai (pemusnah) radikal bertindak menghilangkan radikal lipid ($R\bullet$) yang dihasilkan dalam tindak balas radikal bebas dengan mendermakan atom hidrogen untuk radikal $R\bullet$, akan menjana semula molekul RH , dan tokoferol itu sendiri akan ditukar kepada tokoferil semikuinina radikal ($AH\bullet$). Dua tokoferil semikuinina radikal ($AH\bullet$) boleh bergabung dengan satu sama lain untuk membentuk kuinina tokoferil (A) dan molekul tokoferol. Atau ia boleh dikurangkan dengan atom hidrogen yang didermakan oleh asid askorbik. Asid askorbik teroksida kemudiannya dikurangkan lagi dengan mengurangkan ejen lain, seperti NADH (Packer et al. 2001). Wajar untuk menunjukkan bahawa tokoferol melambatkan atau melambatkan reaksi radikal bebas tetapi tidak sepenuhnya menghentikan tindak balas.

Minyak sawit dikenali dengan kandungan kuantiti tokoferol dan tokotrienol yang tinggi berbanding dengan bahan tumbuhan yang lain. Bagaimanapun, ketika proses penghasilan minyak, kira-kira 30 hingga 40% daripada tokoferol dan tokotrienol hilang oleh kerana pelunturan dan penyahbauan minyak (Erickson, 2000). Tokoferol juga akan hilang semasa proses gorengan menggunakan minyak yang banyak terutamanya α -tokoferol di mana ia lebih cepat hilang berbanding β , γ , dan δ -tokoferol (Boskou, 2008). Selain itu, berbagai bahan bioaktif seperti fitosterol, ester daripada fitosterol, fosfolipid akan hilang ketika mentakrifkan minyak dan menggoreng menggunakan minyak yang banyak (Boskou, 2008).

2.5.2 Flavonoid

Flavonoid adalah istilah kolektif untuk sebatian polifenolik dan berterusan wujud dalam semua bahagian tumbuhan (Nijveldt et al. 2001). Ia dikategorikan kepada flavonol, flavon, flavanon, isoflavon, katekin, antosianidin, dan kalkons berdasarkan struktur kimia. Sejumlah 4,000 flavonoid telah dilaporkan, dan banyak antaranya dipercayai mempunyai aktiviti antioksidan yang bertindak sebagai pemusnah radikal bebas dan

oksigen aktif, pengelat ion besi, dan ejen pentakaktifan liposigenase. Katekin dan kuersetin dipercayai mempunyai aktiviti antioksidan yang tinggi. Oleh sebab itu, ia digunakan untuk menstabilkan lemak khinzir dalam industri makanan (Heim et al. 2002). Kebolehan antioksidan flavonoid adalah berdasarkan kepada ciri-ciri struktur molekulnya. Hidroksilasi (berkaitan dengan kedudukan dan nombor kumpulan hidroksil) cincin B adalah penting untuk aktiviti sedemikian. Kuersetin memainkan peranan penting dan berkemampuan dalam proses antioksidasi kerana ia mempunyai semua ciri-ciri struktur yang tepat untuk memerangkap radikal bebas (Nijveldt et al. 2001).

2.5.3 Asid Askorbik

Asid askorbik ialah antioksidan penting yang bertindak sebagai agen penurunan dan pemusnah radikal bebas. Berdasarkan sifat redoks tersebut, asid askorbik dan derivatif eterfikasi bertindak sebagai antioksidan dengan menderma atom hidrogen kepada tindakbalas rantaian radikal bebas dan melindungi ikatan ganda molekul substrat. Asid askorbik juga boleh berfungsi sebagai pensinergi untuk tokoferol dengan menukar tokoferol teroksida ke dalam bentuk terturun. Tambahan pula, asid dehidroaskorbik dijana semula dengan menggunakan atom hidrogen yang berpunca daripada glutathione reduktase atau NADH (Johnson, 2009).

2.5.4 Karotenoid

Karotenoid adalah sebatian larut lemak semulajadi yang sedia ada wujud di semua bahagian tumbuhan. Sebatian ini kebanyakannya terletak di dalam sistem membran sel di mana salah satu fungsi utama sebatian ini adalah untuk fotosintesis yang mana bertanggungjawab terhadap warna merah, jingga dan kuning pada daun tumbuhan, buahan dan bunga (Delgado-Vargas et al. 2000). Sebatian ini juga ditemui dalam alga, bakteria fotosintesis, bakteria bukan fotosintesis, yis dan kulat (Delgado-Vargas et al. 2000). Ia melindungi membran daripada kerosakan yang disebabkan oleh cahaya dan oksigen (Erikson, 2000; Delgado-Vargas et al. 2000).

Karotenoid adalah sebatian isoprenoid. Majoriti daripada molekul karotenoid mempunyai rantaian polene 40-karbon yang dianggap sebagai tulang belakang molekul (Delgado-Vargas et al. 2000). Seperti sebatian lain, sifat struktur molekul karotenoid akan menentukan ciri kimia dan fungsi biologi mereka. Karotenoid mempunyai ciri yang kaya dengan elektron di mana π -elektron akan delokalisasi sepanjang keseluruhan rantaian polene untuk membuang oksigen singlet. Setiap ikatan berganda dalam rantaian polene daripada karotenoid wujud dalam bentuk salah satu daripada dua konfigurasi yang ada, iaitu: trans atau cis isomer geometri. Oleh kerana isomer cis mewujudkan halangan sterik yang lebih besar antara atom hidrogen berhampiran dan/atau kumpulan metil, mereka secara termodinamik tidak stabil berbanding kumpulan trans yang lain (Britton, 2005). Oleh itu, kebanyakan karotenoid wujud sebagai semua-trans dalam alam semula jadi. Karotenoid semula jadi di dalam larutan organik adalah sangat tidak stabil dengan kehadiran oksigen, menyebabkan ia mudah luntur dan terdegradasi; tetapi karotenoid dalam vivo adalah lebih stabil (Subagio & Morita, 2001).

2.5.5 Antioksidan Semula Jadi yang Lain

Selain memberi kesedaran terhadap keburukan pengambilan minyak yang dipanaskan berulang kali di kalangan masyarakat di seluruh dunia, kini para pengkaji lebih giat mengenalpasti bahan semulajadi yang boleh mengurangkan kesan buruk yang diakibatkan oleh minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali terhadap kesihatan masyarakat (Zakaria et al. 2010). Selain sebatian fenolik, sebatian lain juga dilaporkan mempunyai aktiviti antioksidan. Sebagai contoh, fosfolipid, fitosterol dan sequane (Boskou, 2008; Schuler, 2000). Ekstrak daun teh telah terbukti mempunyai aktiviti antioksidan terhadap lemak khinzir (Shahidi & Wansaundara, 2002).

2.6 ADD-X DAN KEGUNAAN TERAPEUTIKNYA

ADD-X adalah ekstrak yang diperoleh daripada bahagian tumbuhan dalam keluarga Rutaceae. Terdapat beberapa jenis pokok Rutacea seperti *genus Citrus*, *Aegle* dan *Murraya koeniggi*. Tinggi pokok Rutacea mencapai enam meter dan distribusinya

tersebar di daerah beriklim tropis dan subtropis. Daun Rutacea secara keseluruhan berukuran 4 hingga 15 cm panjang (Fabroni et al. 2016; Rahman et al. 2016).

Daun pokok Rutacea genus *Citrus* memiliki aroma spesifik kerana mengandungi minyak atsiri. Minyak atsiri pada daun Rutacea terdiri daripada metabolit sekunder yang tinggi contohnya seperti daun oren yang mengandungi sinerfin, flavonoid, herperidine, rhoifolin, limonene, dan linalol, manakala buah daripada spesies pokok Rutacea ini turut mempunyai asid askorbik. Sifat dan kebaikan flavanoid dan asid askorbik telah dijelaskan diatas. Pokok Rutacea mempunyai sifat yang boleh menurunkan paras kolesterol. Liu et al. (2016) melaporkan bahawa daun daripada pokok spesies Rutacea didapati boleh mengurangkan lelah, berat badan dan keradangan kulit.

Maja (*Aegle marmelos*) terdiri daripada pokok genus *Murraya koeniggi* yang juga dikenali sebagai daun kari mempunyai sifat anti-diabetik, anti-inflamatori dan anti-kanser. Pokok genus *Murraya koeniggi* merupakan tumbuhan renek yang berasal dari keluarga Rutaceae dari spesies *Murraya koeniggi* dan mengeluarkan daun kecil berwarna hijau (Sharma et al. 2016; Rahman et al. 2016). Daun kari ini biasanya bermanfaat dan berkhasiat menambah bau harum masakan dalam masyarakat India. Pokok kari juga dikenali sebagai 'kariveppilai' dalam bahasa Tamil, juga dipanggil 'neem hitam', kerana daunnya mirip dengan pohon neem yang pahit, walaupun tidak ada hubungan dengan pokok neem. Daun kari merupakan tonik herba untuk menguatkan perut dan meningkatkan keupayaannya serta mengatasi masalah penghadaman. Ia juga boleh digunakan sebagai laksatif (julap) lemah untuk mengatasi masalah sembelit. Jus daun kari yang dicampur dengan madu juga dapat menjadi penawar kepada cirit birit dan buasir (Patel et al. 2016). Jus daunnya yang segar dicampur dengan jus limau nipis digunakan untuk mengatasi masalah loya dan pening terutamanya akibat makan lemak yang berlebihan (Nalli et al. 2016). Air rebusan kulit batangnya yang kering dapat digunakan untuk mengubat diabetes (Ma et al. 2016).

ADD-X yang akan ditambahkan ke dalam minyak masak semasa memasak didapati mengurangkan penyerapan minyak ke dalam makanan yang digoreng (Mohamed & Nor, 2013). Ekstrak ADD-X adalah sebatian pelengkap yang disediakan oleh syarikat Agrosains bersama Institut Biosains, Universiti Putra Malaysia (UPM). Bahan tambahan ini juga mempunyai ciri-ciri antioksidan, anti-hipertensi, anti-histamin,

anti-bakteria, anti-hiperkolesterol, anti-inflamasi dan sifat pelindung kanser. Kajian Mohamed (2013) menunjukkan ADD-X meningkatkan kegarangan, rasa dan kualiti keseluruhan produk yang digoreng. Bahan tambahan ADD-X terbukti berfungsi sebagai antioksidan lemak semulajadi, perencat penyerapan minyak dan juga mempunyai sifat penambah-baikkan kesihatan lain lalu menjadikan makanan bergoreng kurang berbahaya kepada kesihatan. Ekstrak ADD-X mengandungi sebatian fenolik daripada pinene, citronellal, terpinen-4-ol, citronellol, citronellyl asetat, geranial, asetat geranial, neral, karotenoid, tokoferol, tokotrienol, flavonoid, eriositrin, neoeriositrin, narirutin, hesperidin, neohesperidin, didymin, lutein, furocoumarins dan carbazole. (Nombor Paten: US 8425969 B2). Fenolik telah digunakan dalam industri makanan selama beberapa dekad oleh kerana fungsinya yang berupaya dalam mencegah pengoksidaan asid lemak poli tidak tepu dalam makanan yang mengandungi lemak atau minyak. Ia juga mempunyai aktiviti antioksidan yang bertindak sebagai pemusnah radikal bebas yang meningkatkan parameter antioksidan, tetapi mengurangkan penanda inflamasi pada tisu jantung (Khan & Shahidi, 2001). Pernyataan ini telah disokong oleh kajian yang dijalankan oleh Mohamed dan Nor (2013) dalam teknologi makanan, di mana ia berupaya mengurangkan penyerapan minyak dalam makanan yang bergoreng. Penemuan penyelidikan ini telah diiktiraf dan dianugerahkan pingat emas di BioMalaysia 2012.

2.7 MODEL EKSPERIMEN

Tikus yang diberi makanan bercampurkan minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali menggunakan formula 15% dan formula adalah mengikut protokol kajian yang digunakan oleh pegkaji terdahulu Owu et al. (1998). Sebelum penentuan penggunaan formula tersebut, beberapa keputusan hasil kajian terdahulu yang menggunakan formula sama telah mendapati pengambilan 15% minyak kelapa sawit yang dipanaskan meningkatkan berat badan dan tekanan darah (Jaarin et al. (2011), Leong et al. (2010) dan Ng et al. (2012) malah telah menunjukkan kesan buruknya terhadap tisu jantung di mana nekrosis diperhatikan pada sel jantung tikus kajian berkenaan (Leong et al. 2008). Tikus Sprague-Dawley berupaya untuk meningkatkan berat badan, tekanan

darah dan mengakibatkan kerosakan tisu jantung. Model ini boleh digunakan bagi menentukan mekanisme obesiti dan peningkatan tekanan darah.

Tindak balas kolesterol plasma terhadap kolesterol pemakanan sangat mudah berubah mengikut spesies haiwan. Walaupun arnab adalah sangat mudah terdedah kepada kolesterol pemakanan, tikus dan anjing pula menunjukkan perubahan jumlah kolesterol plasma yang sedikit walaupun dengan dos kolesterol pemakanan yang tinggi. Respon primat atau habitat bukan manusia terhadap kolesterol pemakanan juga mudah berubah (McNamara, 2000). Tambahan lagi, dengan dos kolesterol pemakanan yang sangat tinggi (0.5-2 mg / kcal atau 1250-5000 mg/ 2500 kcal) boleh menyebabkan hiperkolesterolemia dan aterosklerosis.

Selain itu, kebanyakan spesies haiwan mempunyai profil plasma lipoprotein yang jauh berbeza berbanding dengan manusia. Manusia mempunyai kolesterol LDL sebagai lipoprotein plasma yang utama manakala kebanyakan model haiwan mempunyai HDL sebagai pecahan utama. Perbezaan spesies yang berbeza mempunyai respon yang juga berbeza terhadap kolesterol pemakanan dan penggunaan dos farmakologi dalam banyak kajian. Perbezaan dalam plasma lipoprotein membuatkan penentuan polar hasil kajian untuk memberi makanan kepada haiwan model eksperimen menjadi susah.

Penggunaan model haiwan yang sesuai adalah penting untuk kajian mekanisme disebalik aktiviti jantung dan perkembangan strategi terapeutik. Walau bagaimanapun, model haiwan ideal yang boleh menyerupai aterosklerosis koronari manusia dan seterusnya sakit jantung akut masih kurang. Model haiwan yang sempurna seharusnya memaparkan luka koronari yang menyerupai atau hampir sama dengan apa yang dilihat dalam aterosklerosis manusia. Kekurangan model seperti ini telah menghalang kajian untuk mengesahkan teknologi pengimejan dan meneliti kesan terapeutik dalam arteri aterosklerotik (Granada et al. 2009). Tambahan pula, masalah utama dalam model haiwan terkini yang mempunyai penyakit kardiovaskular adalah perbezaan komposisi lipoprotein yang sangat berbeza daripada manusia (Fernandez dan Volek, 2006).

Terdapat beberapa model haiwan eksperimen yang digunakan dalam kajian aterosklerosis seperti arnab, tikus, khinzir dan monyet. Pembentukan aterosklerosis boleh disebabkan oleh diet yang kaya dengan lipid, atau diubahsuai secara genetik menyebabkan hiperlipidemia dan penyakit kardiovaskular. Dalam model haiwan seperti

monyet dan khinzir, luka dihasilkan di dalam arteri hampir serupa dengan manusia (Granada et al. 2009) di bahagian intimal dan menyebabkan pembesaran abnormal akibat daripada tekanan mekanikal dan pengaliran darah terhadap dinding arteri, kebiasaannya dijumpai dalam bahagian iliak dan cabang lain. Walau bagaimanapun, disebabkan spesies haiwan ini memerlukan penjagaan yang dan kos harga yang lebih mahal ia menjadi salah satu halangan untuk menggunakan haiwan ini sebagai model kajian ini. Oleh itu, haiwan yang lebih kecil seperti tikus Sprague-Dawley menjadi pilihan.



BAB III

BAHAN DAN KAEDAH

3.1 BAHAN

3.1.1 Haiwan Kajian

Haiwan yang digunakan dalam kajian ini adalah tikus betina *Sprague-Dawley* dengan berat badan 250 hingga 300g. Haiwan ini telah diperolehi daripada Unit Sumber Haiwan Makmal, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia. Haiwan ini telah dikendalikan berdasarkan kepada peraturan pengendalian haiwan yang telah diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC). Sijil dan nombor kelulusan (UKMAEC) bagi kajian ini adalah: FP/ANAT/2014/FAIZAH/26-NOV/634-NOV-2014-SEPT.-2015

3.1.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang telah digunakan dalam kajian ini adalah seperti yang disenaraikan berikut:

A. Penyediaan Makanan Tikus

- a) Makanan tikus komersial (Gold Coin Sdn Bhd.,Malaysia)
- b) Minyak kelapa sawit Cap Buruh (Lam Soon Sdn Bhd.,Malaysia)
- c) Ekstrak ADD-X (Syarikat Agrosience bersama UPM)

B. Pengukuran Nilai Peroksida

- a) Kanji kentang (sigma-Aldrich, USA)
- b) Asid astik (Merck KGaA, Jerman)
- c) Kalium iodide (Sigma-Aldrich, USA)
- d) Asid hidroklorik (Merck KGaA, Jerman)
- e) Larutan kloroform (Merck KGaA, Jerman)
- f) Natrium tiosulfat (Sigma-Aldrich, USA)
- g) Kalium dikromat (Sigma-Aldrich, USA)

C. Prosedur Ovariektomi

- a) Ketamin (Makmal Troy, Australia)
- b) Xylazin (Makmal Troy, Australia)
- c) Antibiotik Baytril (Bayer, Korea)
- d) Iodin providon (PT Mahakam Beta Farma, Indonesia)
- e) Salina normal steril (*Sterile Normal saline*) (Diethlem, Malaysia)

D. Pengukuran Nilai Superoksida Dismutase (SOD)

- a) Kit *superoxide dismutase assay* (Cayman Chemical, USA)

E. Pengukuran Nilai Katalase (CAT)

- a) Kit *Catalase assay* (Cayman Chemical, USA)
- b) Hidrogen peroksida (Cayman Chemical, USA)
- c) Metanol (Cayman Chemical)

F. Pengukuran Nilai Glutation (GSH)

- a) Kit *guthathione assay* (Cayman Chemical, USA)
- b) Metafosforik asid (BioVision Research Product, USA)
- c) Tritanolamin (BioVision Research Product, USA)

G. Pengukuran Nilai TBAR

- a) Kit *thiobarbiuric acid reactive substance* (TBARS) *assay* (Cayman Chemical, USA)

H. Persampelan Tisu

- a) Anestetik dietil ester (R&M Chemicals, UK)
- b) Formaldehid (R&M Chemicals, UK)
- c) Disodium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4)
- d) Sodium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4)

I. Pengukuran Nilai C-Reaktif Protein (CRP)

Kit *C-Reaktif Protein* (CRP) *Elisa* (Elabscience, Wuhan)

J. Pengukuran Nilai Faktor- α Nekrosis Tumor (TNF- α)

Kit *Tumor Nekrosis Factor- α* (TNF- α) *Elisa* (Elabscience, Wuhan)

K. Pengukuran Nilai Troponin (cTn)

Kit *Troponin* (cTn) *Elisa* (Elabscience, Wuhan)

L. Pengukuran Nilai Laktat Dehidrogenase (LDH)

Kit *Lactate Dehidrogenase* (LDH) *assay* (Biovision, USA)

M. Pengukuran Nilai Asid Lemak Bebas (FFA)

Kit *Free fatty acid* (FFA) *assay* (BioAssay, USA)

N. Pengukuran Nilai Trigliserida (TG)

Kit *Tryglyceride* (TG) *assay* (BioAssay, USA)

O. Pemprosesan Tisu Jantung

- a) Larutan etanol 100% (HmbG Chemicals, Jerman)

- b) Larutan etanol 95% (vision Scientific, Korea)
- c) Larutan xilena (Merck KGaA, Jerman)
- d) Larutan toluene (Merck KGaA, Jerman)
- e) Parafin (Sigma-Aldrich, USA)

P. Penyediaan Dan Pewarnaan Hematoksilin Dan Eosin

- a) Larutan etanol 100% (HmbG Chemicals, Jerman)
- b) Larutan etanol 95% (vision Scientific, Korea)
- c) Larutan xilena (Merck KGaA, Jerman)
- d) Asid asetik (Merck KGaA, Jerman)
- e) Asid hidroklorik (Merck KGaA, Jerman)
- f) Aluminium kalium sulfat (Merck KGaA, Jerman)
- g) Hematoksilin (BDH Chemicals,UK)
- h) Eosin (BDH Chemical, UK)
- i) Merkuri (II) oksida (Asia Pacific Speciality Chemicals, Australia)

Q. Penyediaan dan Pewarnaan Oil Red O

- a) Larutan etanol 100% (HmbG Chemicals, Jerman)
- b) Larutan etanol 95% (vision Scientific, Korea)
- c) Larutan xilena (Merck KGaA, Jerman)
- d) Asid asetik (Merck KGaA, Jerman)
- e) Asid hidroklorik (Merck KGaA, Jerman)
- f) Aluminium kalium sulfat (Merck KGaA, Jerman)
- g) *Oil-red-O* (SchwannCells,USA)
- h) Isopropanol (Vision Scientific,Korea)
- i) Formalin (HmbG Chemicals, Jerman)

3.1.3 Alat Radas

Alat radas yang telah digunakan dalam kajian ini adalah seperti yang disenaraikan berikut:

A. Penempatan Haiwan Kajian

Haiwan kajian telah ditempatkan di Jabatan Anatomi, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia

B. Pemanasan Minyak Kelapa Sawit

- a) Kualiti besi tahan karat (*Stainless steel*)
- b) Jangkasuhu digital Digi-Sense 91100-40 (Cole-Palmer Instrument, USA)
- c) Alat penimbang Tanita 1141 (Tanita Jepun)

C. Penyediaan Makanan Haiwan Kajian

- a) Ketuhar (Mommert, Jerman)
- b) Alat pengisar FFC-15 (Qingdao Xinfengte Machinery co. Ltd., China)
- c) Alat penimbang (Tanita, Jepun)
- d) Dulang pembakar

D. Prosedur Ovariectomy

- a) Mesin pencukur (Panasonic, china)
- b) Benang Catgut (Serag, Jerman)
- c) Benang Mersilk (Serag, Jerman)
- d) Jarum picagari 26G x ½" (Terumo, Jepun)

E. Penentuan Pengambilan Makanan dan Berat Badan Haiwan Kajian

- a) Alat penimbang digital Tanita 1144 (Tanita, Jepun)

F. Pengukuran Nilai Peroksida

- a) Kelengkapan kon 250ml (Duran Schott, Jerman)
- b) Kelalang isipadu (Emil Gold Line, UK)

- c) Penyukat silinder (Exelo Permagold, UK)
- d) Corong uras (Duran Schott, Jerman)
- e) Pemegang buret (CF Paler, UK)
- f) Buret (Duran Schott, Jerman)

G. Pengukuran Tekanan Darah

- a) Sistem CODA Data PowerLab (ADInstrument, Australia)
- b) Bekas penahan haiwan kajian (Jabatan Anatomi)

H. Pensampelan dan Pemprosesn Tisu

- a) Desikator Dry-Seal (Jencons Scientific, USA)
- b) Alat penimbang mekanik Harvard Trip (Ohaus, USA)
- c) Mesin pembuat ais ketul Scotsman AF10 (Scotsman Ice System, USA)
- d) Mesin pengempar Heraeus Labofuge 400 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- e) Mesin pengempar Microfuge® 22R Centrifuge (Beckman Coulter, USA)
- f) Peti Sejuk -70°C Reveo Hubbard (thermo Fisser Scientific, USA)
- g) Kit Biji Besi OMNI (OMNI-IN.,USA)
- h) Mesin penghomogen (OMNI Bead Ruptor-24, USA)
- i) Pemproses tisu automatik (Microm STP 1201-1 Jerman)

I. Pengukuran Kajian Biokimia

- a) Tip mikropipet 10 μ L, 100 μ L dan 1000 μ L (Aras I, Malaysia)
- b) Tiub endrof 1.5ml (Eppendorf, Jerman)
- c) Rak tip mikropipet EppendorfPhysioCareConcept® (Eppendorf, Jerman)
- d) Mikropipet 10 μ L, 100 μ L dan 1000 μ L (Eppendorf, Jerman)
- e) Mikropipet pelbagai saluran 300 μ L (Eppendorf, Jerman)
- f) Piring 96 telaga bersalut antibodi (Cayman Chemical USA)
- g) Piring 96 telaga (elabScience, Wuhan)
- h) Piring 96 telaga (Biossay, USA)
- i) Mesin Vortex SA3 Sturat (Bibby Scientific Ltd., UK)
- j) Mesin pengoyang orbital Lab-Line Junior (Lab-Line Instruments, USA)

- k) Sistem penapisan air ProGrad 2 Direct-Q (Merck Milipore, USA)
- l) Alat pencuci piring ELISA (ThermoScientific, Jerman)
- m) Mesin Pembaca Elisa VersaMax (Molecular Devices, USA)
- n) Program Perisian SOFTmax[®]PRO versi 3.1.2 (Molecular Devices, USA)

J. Penyediaan Blok Parafin Tisu Jantung

- a) Mesin pembenaman tisu Leica EG1160 (Leica Microsystem, Jerman)
- b) Acuan pembenaman (Leica Microsystem, Jerman)
- c) Ketuhar (Mommert, Jerman)

K. Penyediaan Slaid Tisu Jantung

- a) Mesin mikrotom Leica RM2235 (Leica Microsystem, Jerman)
- b) Mandian air Leica H11210 (Leica Microsystem, Jerman)
- c) Plat pemanasan Leica (Leica Microsystem, Jerman)
- d) Mata pisau mikrotom (Leica Microsystem, Jerman)
- e) Slaid kaca mikroskop (SIP TexNet Medical, China)
- f) Slaid bersalut polilisin Menzel-Glaser (Thermo Scientific, Jerman)
- g) Pentup slip slaid bersaiz 18 x 18 mm dan 24 x 18 mm (Chance Proper, UK)
- h) Kotak slaid kayu

L. Pewarnaan Histologi

- a) Bekas pewarnaan kaca dan besi
- b) Mikroskop cahaya Olympus CX31 (Olympus Corporation, Jepun)
- c) Kertas turas 18.5 cm (Whatman, UK)
- d) Pipet Pasteur 3ml (Nerbe Plus GmbH, Jerman)
- e) Jam Randik (Strato 7 Jewels, Switzerland)

M. Pengukuran Morfometri

- a) Mikroskop cahaya Nikon Eclipse 80i (Nikon Corporation, Jepun)
- b) Kamera MicroPublisher 5.0 RTV (QImaging, Kanada)

- c) Program perisian penganalisa imej Image-Pro Plus Versi &.0 (Media Cybernetics,USA)

3.2 REKA BENTUK KAJIAN

Tikus betina Sprague-Dawley sebanyak 42 ekor dengan berat badan di antara 250 hingga 280g telah digunakan. Semua tikus tersebut dibela dalam sangkar polietilena dengan penutup besi tahan karat pada suhu bilik iaitu $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Setiap tikus diletakkan dalam sangkar berasingan dan dibiarkan selama seminggu bagi menyesuaikan diri dengan persekitaran sebelum kajian dimulakan. Semua tikus tersebut diberikan diet asas tikus (makanan tikus komersial) dan air paip secara *ad libitum* selama seminggu tersebut.

Selepas seminggu penyesuaian berakhir, kesemua 42 ekor tikus telah dibahagikan sama rata kepada tujuh kumpulan secara rawak dengan bilangan enam ekor tikus dalam setiap kumpulan. Tujuh kumpulan terdiri daripada kumpulan kawalan (SHAM), kumpulan ovariektomi dengan diet asas tikus [OVX(n)], kumpulan ovariektomi dengan diet 2% kolesterol [OVX(c)], kumpulan minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima kali (5HPO), kumpulan kelapa minyak sawit dengan penambahan ekstrak ADD-X dipanaskan lima kali (5HPO-X), kumpulan minyak kelapa sawit dipanaskan sepuluh kali (10HPO) dan kumpulan minyak kelapa sawit dengan penambahan ekstrak ADD-X dipanaskan sepuluh kali (10HPO-X).

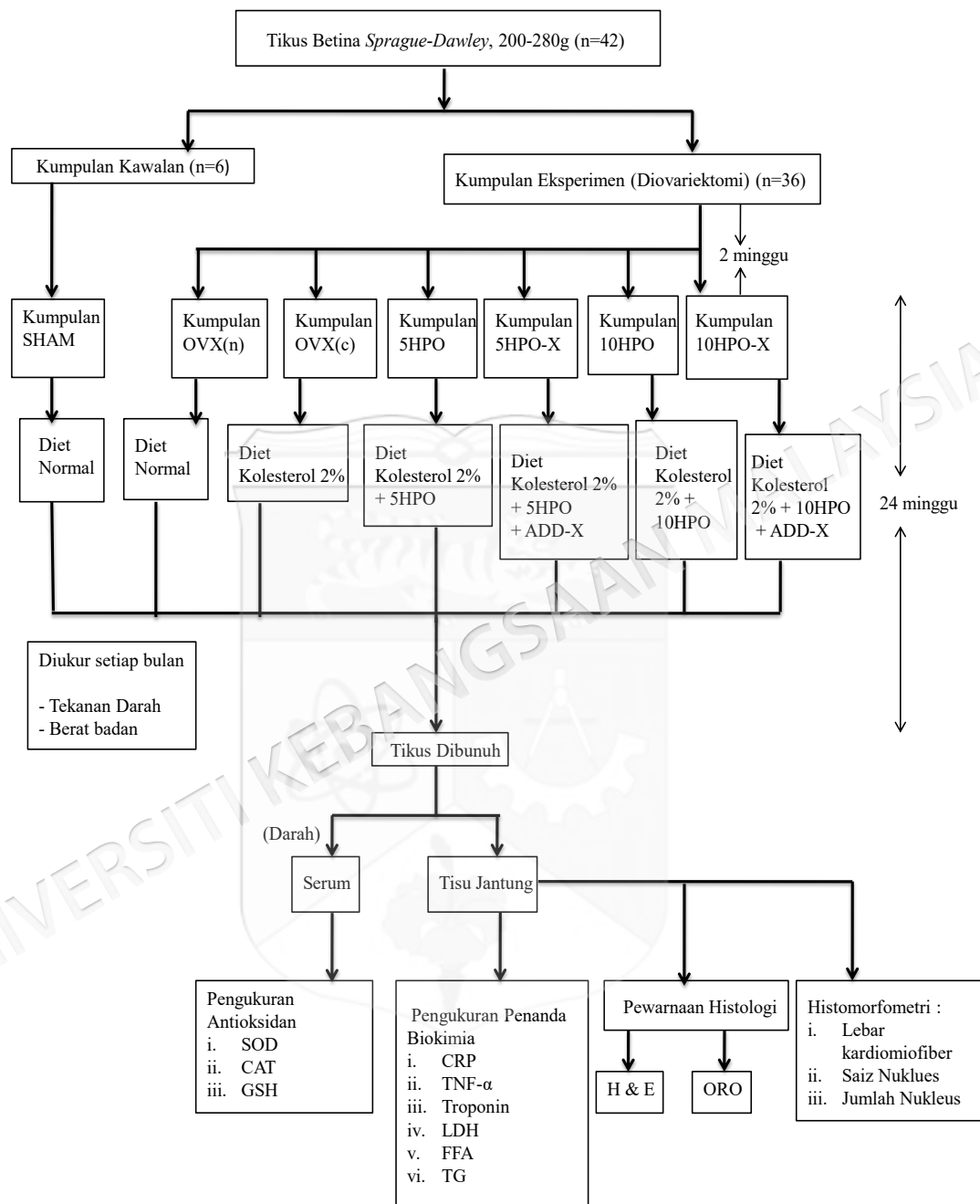
Prosedur ovariektomi dijalankan dengan mengenakan anestetik Kepatax: Xylazil (1:1) dengan menyuntik sebanyak 0.1 ml secara intramuskular bagi setiap 100g berat badan tikus. Selepas pemberian anestesia, bulu pada bahagian abdomen tikus dicukur dengan menggunakan mesin pencukur. Satu incisi sepanjang 1 sm dilakukan pada bahagian tengah abdomen dan kedua-dua ovari telah dikenalpasti. Tiub Fallopian diikat dan kemudian kedua-dua ovari dipotong dengan menggunakan gunting sebelum dibuang. Bahagian bukaan abdomen tersebut dijahit dengan menggunakan benang Catgut bagi lapisan dalam kulit, manakala benang Mersilk digunakan bagi menjahit lapisan luar kulit. Kumpulan tikus SHAM menjalani prosedur pembedahan dimana kedua-dua ovari didedahkan dan dimanipulasikan secara berhati-hati tetapi tidak dipotong malah dimasukkan kembali ke dalam abdomen. Sebanyak 0.1 ml ubat antibiotik Baytril

disuntik pada bahagian peritoneum untuk profilaksi jangkitan. Cecair iodine juga disapu pada bahagian jahitan tersebut. Rawatan dimulakan dalam tempoh dua minggu selepas prosedur ovariectomi untuk memberikan masa penyembuhan kepada tikus kajian.

Sebelum kajian dimulakan ke atas tikus tersebut, nilai peroksida bagi sampel minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima kali, sepuluh kali, minyak sawit yang dipanaskan lima dan sepuluh kali dengan penambahan ADD-X ditentukan terlebih dahulu.

Selepas dua minggu tikus terovariectomi sembuh sepenuhnya, tikus kumpulan kawalan diberi diet asas tikus tanpa sebarang tambahan bahan lain manakala tikus kumpulan lain diberi makanan mengikut kumpulan. Tikus kumpulan OVX(n) diberi diet asas tikus. Tikus kumpulan OVX(c) pula, diberi diet kolesterol 2%. Tikus kumpulan 5HPO diberi makanan tikus kolesterol 2% dengan 15% minyak yang dipanaskan lima kali. Tikus kumpulan 5HPO-X pula, diberi makanan tikus kolesterol 2% dengan minyak yang dipanaskan lima kali bersama ekstrak ADD-X. Tikus kumpulan 10HPO diberi makanan tikus kolesterol 2% dengan 15% minyak yang dipanaskan sepuluh kali. Akhir sekali, kumpulan 10HPO-X diberi makanan kolesterol 2% dengan 15% minyak yang dipanaskan bersama ekstrak ADD-X. Ekstrak ADD-X ditambah dalam minyak kelapa sawit dengan nisbah 1:10 (Mohamed & Nor, 2013)

Semua tikus dijaga rapi setiap hari selama 24 minggu. Berat badan kesemua tikus telah diukur pada hari pertama sebelum kajian dimulakan dan pada setiap minggu sehingga minggu kedua puluh empat. Tekanan darah telah diukur dengan cara kuff ekor pada hari pertama sebelum kajian dimulakan dan diikuti pada hari akhir setiap empat minggu selama dua puluh empat minggu. Selepas dua puluh empat minggu tempoh kajian, sampel darah tikus dari semua kumpulan diambil melalui sinus retro-orbital untuk kajian analisis biokimia. Sampel darah diempar untuk mendapatkan serum. Selepas itu, semua tikus dibunuh. Sebahagian jantung tikus diambil untuk kajian analisis biokimia. Manakala ventrikel kiri diambil untuk kajian histologi dan histomorfometri. Kajian histologi adalah dengan pewarnaan hematoxylin dan eosin (H&E) dan pewarnaan Oil Red O. Rajah 3.1 menunjukkan ringkasan reka bentuk kajian ini.



Rajah 3.1 : Reka Bentuk Kajian

3.3 PENYEDIAAN MAKANAN DAN PERLAKUAN PADA TIKUS

3.3.1 Penyediaan Minyak Kelapa Sawit (5HPO & 10HPO)

Minyak kelapa sawit segar yang digunakan dalam kajian ini telah diperoleh daripada kedai runcit tempatan dan ianya kemudian dipanaskan selama lima kali dan sepuluh kali secara berulang. Kaedah pemanasan minyak (Cap Buruh, Lam Soon Sdn Bhd., Malaysia) dilakukan mengikut kajian terdahulu oleh Owu et al. (1998) dengan modifikasi (Adam et al. 2009; Leong et al. 2009; Jaarin et al. 2011; Ng et al 2012). Berdasarkan kepada kajian tersebut, sebanyak 2.5L minyak kelapa sawit segar dipanaskan di dalam kualiti besi tahan karat sehingga suhu mencapai 180°C. Setelah itu, sebanyak 1 kg ubi keledak (Adam et al. 2009) yang telah dipotong nipis dimasukkan ke dalam minyak yang telah dipanaskan itu dan digoreng selama 10minit. Selepas 10 minit, ubi keledak tersebut dikeluarkan daripada minyak panas tadi dan minyaknya dibiarkan menyejuk selama lima jam sebelum ianya dipanaskan lagi. Ini adalah hasil pemanasan minyak kelapa sawit satu kali. Untuk mendapatkan 5HPO dan 10HPO, minyak yang disejukkan tadi dipanaskan lagi tanpa ditambah minyak kelapa sawit segar baru sehingga suhu mencapai 180°C dan 1kg ubi keledak yang baru dimasukkan ke dalam minyak panas dan digoreng selama 10minit lagi. Kemudian ubi keledak dikeluarkan dan minyak tersebut dibiarkan sejuk selama 5 jam lagi. Seluruh proses pemanasan minyak kelapa sawit ini berulang sebanyak tiga dan lapan kali lagi bagi mendapatkan minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima dan sepuluh kali.

3.3.2 Penyediaan Minyak Kelapa Sawit Bersama Ekstrak ADD-X

Ekstrak ADD-X diperoleh daripada syarikat tempatan Agrosains bersama Institut Biosains, UPM. Ianya dibekalkan dalam bentuk segar dan sedia guna. Ekstrak ADD-X

telah diberikan kepada tikus bersama campuran makanan tikus (5HPO dan 10HPO), iaitu ADD-X ditambah dalam minyak yang dipanaskan lima dan sepuluh kali masing-masing (5HPO-X dan 10HPO-X). Ekstrak ADD-X telah ditambah dalam minyak kelapa sawit sebelum proses pemanasan sebanyak 1:10 (ADD-X: minyak kelapa sawit), kemudian digoreng sebanyak lima kali tanpa penambahan ekstrak ADD-X segar. Manakala bagi penyediaan 10HPO-X pula, ekstrak telah ditambah sebelum proses pemanasan dan sekali lagi pada kali ke-enam pemanasan minyak kelapa sawit. Kuantiti ekstrak ADD-X yang digunakan adalah seperti yang disarankan oleh syarikat pengeluar (Agrosains dan Institut Biosains, UPM)

3.3.3 Penyediaan Makanan Tikus Kajian

Makanan bagi semua tikus dalam kumpulan eksperimen telah disediakan berdasarkan kaedah yang telah dihuraikan oleh Owu et al. (1998). Pellet makanan tikus komersial dikisar sehingga halus dengan menggunakan mesin pengisar. Pellet makanan tersebut kemudiannya dicampurkan dengan 15% minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima (5HPO) dan sepuluh kali (10HPO) masing masing. Cara penyediaan makanan untuk kumpulan tikus 5HPO-X dan 10HPO-X pula adalah dengan mencampurkan makanan komersial tikus yang dikisar dengan nisbah 1:10 ekstrak ADD-X bersama minyak sawit yang dipanaskan, iaitu setiap 900g makanan:100g ekstrak ADD-X akan ditambah. Semasa gaulan dengan minyak, sedikit air dicampurkan dan makanan tersebut diuli sehingga adunan rata. Adunan makanan tersebut dibentukkan semula dalam bentuk pellet dan dikeringkan dalam ketuhar bersuhu 80% selama kira-kira 24 jam. Pellet makanan tikus yang siap dikeringkan, telah disimpan dalam bekas plastik bersih serta kering kerana kelembapan boleh mengakibatkan pertumbuhan mikroorganisma dan merosakkan makanan tersebut.

3.3.4 Pemberian Makanan Tikus Kajian

Setiap ekor tikus dalam kajian ini telah diberi 30g makanan sehari mengikut kumpulan kajian masing-masing. Pada setiap pagi sebelum diberi makanan, baki makanan dari hari

sebelum itu telah ditimbang dengan alat penimbang elektronik digital bagi penentuan jumlah pengambilan makanan oleh setiap tikus.

3.3.5 Pengukuran Berat Badan Tikus Kajian

Berat badan bagi setiap tikus dalam kajian ini telah dipantau dengan menimbang pada permulaan kajian dan setiap minggu sepanjang tempoh kajian iaitu selama 24 minggu. Pengukuran berat badan tikus telah dilakukan dengan menggunakan alat penimbang digital. Semua tikus telah diperhatikan dengan teliti di sepanjang tempoh kajian bagi sebarang perubahan fizikal dan pertumbuhan mereka.

3.3.6 Persampelan Serum Darah Tikus Kajian

Pada akhir tempoh kajian iaitu pada hari pertama minggu ke dua puluh lima, darah semua kumpulan tikus diambil menggunakan tiub kapilari melalui sinus retro-orbital. Darah kemudian diempar untuk mendapatkan sampel serum.

3.3.7 Persampelan Tisu Jantung Tikus Kajian

Pada akhir tempoh kajian selepas pengambilan darah, tikus telah dibunuh dan sampel tisu jantung setiap tikus telah diambil. Tisu jantung kecuali ventrikel kiri telah dibersihkan dengan air suling lalu dibungkus dengan kerajang aluminium dengan segera dan disimpan dalam kotak ais sementara. Setiap sampel telah dilabelkan dengan identiti diri, kumpulan nama sampel dan tarikh. Sampel tisu jantung telah disimpan pada suhu -70°C sehingga pengukuran analisis biokimia dilakukan. Manakala tisu ventrikel jantung ini telah dibersihkan dan dimasukkan ke dalam larutan formalin berpenimbal fosfat 10% sehingga tisu tersebut diproseskan.

3.4 PENENTUAN NILAI PEROKSIDA

Kandungan nilai peroksida bagi minyak kelapa sawit segar (FPO), minyak kelapa sawit segar dengan ekstrak ADD-X (FPO-X), 1HPO, 1HPO-X, 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X yang digunakan dalam kajian ini telah ditentukan dengan kaedah titrasi. Berikut adalah proses penyediaan larutan untuk pengukuran nilai peroksida.

a. Larutan Asid Asetik-Kloroform

Tiga bahagian isipadu asetik asid glasial dicampurkan dengan dua bahagian isipadu kloroform.

b. Kalium Iodida Tertepu

Satu larutan tertepu telah disediakan dalam 20 ml air suling yang baru dididih. Kalium iodida telah dimasukkan ke dalam air suling seperti dinyatakan di atas sehingga ianya tidak larut. Larutan ini perlu disimpan di tempat gelap bagi mengekalkan ketepuan untuk penentuan nilai peroksida.

c. Natrium Tiosulfat

Sebanyak 2.48g natrium tiosulfat dicampurkan ke dalam 1000ml air suling. Kemudian campuran ini dipanaskan dan dikacau sehingga larut.

d. Larutan Kanji Kentang (10%)

Sebanyak 10g kanji ubi dicampurkan ke dalam 100 ml air suling dan campuran ini dipanaskan serta dikacau sehingga larut.

3.4.1 Pemiawaian Larutan Natrium Tiosulfat

Larutan natrium tiosulfat telah disediakan dengan nilai piawainya ditentukan pada 0.01 N. Untuk penyediaan larutan ini, sebanyak 0.01 ± 0.02 g kalium dikromat dimasukkan ke dalam kelalang kon. Sejumlah 0.5 g kalium iodida telah dicampurkan dengan 10 ml air

suling lalu dilarutkan. Kemudian, larutan kalium iodida dimasukkan ke dalam kelalang kon bersama kalium dikromat dan dilarutkan bersama.

Kemudian, 10 ml larutan hidrogen klorida (asid hidroklorik) 10% dicampurkan ke dalam larutan kalium dikromat dan kalium iodida lalu digoncangkan dengan sebatu selama satu minit. Selepas itu, larutan dititratkan dengan larutan natrium tiosulfat 0.01 N sehingga warna larutan itu bertukar kepada warna kuning muda.

Selepas itu, larutan kanji kentang 10% sebanyak 0.05 ml telah dititiskan ke dalam larutan tadi supaya ia bertukar ke warna biru keabu-abuan. Kemudian, titrasi diteruskan dengan larutan natrium tiosulfat 0.01 N sehingga warna biru hilang. Pada masa ini jumlah isipadu larutan natrium tiosulfat yang telah dikira menggunakan formula berikut:

$$N = 1000 \times K / 49 \times V$$

Petunjuk:

K: Berat (g) kalium dikromat

V: Isipadu (ml) larutan natrium tiosulfat yang telah digunakan

Adalah penting bagi menentukan pemiawaian larutan natrium tiosulfat dilakukan setiap kali sebelum digunakan untuk titrasi kerana normaliti larutan ini digunakan dalam pengiraan nilai peroksida.

3.4.2 Penentuan Nilai Peroksida dalam Sampel Minyak Kajian

Nilai peroksida adalah kaedah penentuan tahap pengoksidaan dalam sampel lipid. Ia juga merupakan kaedah untuk mengukur pembentukan kumpulan peroksida dan hidroperoksida yang merupakan hasil awal dalam pengoksidaan lipid. Nilai peroksida juga digunakan bagi penentuan tahap pengoksidaan lipid dan pengukuran jumlah iodin (I_2). I_2 adalah hasil daripada tindakbalas di antara peroksida ROOH yang hadir dalam minyak dengan ion iodin (I^-) yang hadir dalam larutan kalium iodida. Nilai peroksida dalam sampel minyak kajian ini telah ditentukan dengan menggunakan cara titrasi iodometrik (Official Method Cd 8-53) Persatuan Ahli Kimia Minyak Amerika (*American Oil Chemists' Society*, AOCS 2003). Nilai peroksida dibaca dalam unit mili setara

oksigen aktif per kilogram lemak atau minyak (*miliequivalents of active oxygen per kilogram of fats or oils*, mEqO₂/kg).

Sejumlah 5 ± 0.05 g sampel minyak telah ditimbang dan dimasukkan ke dalam kelalang kon sebesar 250 ml. Justeru itu, 30 ml larutan asid asetik-kloroform yang telah disediakan terlebih dahulu dimasukkan ke dalam sampel minyak tadi dan digoncang sehingga semua sampel minyak telah larut. Kemudian, 0.5 ml larutan kalium iodida tepu dimasukkan ke dalam kelalang kon yang sama dan larutan digoncang selama satu minit. Setelah itu, 30 ml air suling dimasukkan ke dalam campuran tadi dan ianya telah digoncang lagi supaya iodin yang terdapat dalam lapisan kloroform dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam air suling. Selepas itu, dua lapisan larutan dapat dilihat, dimana lapisan bawah terdiri daripada campuran minyak dengan kloroform manakala lapisan atas pula, merupakan air suling dengan iodin telah terbebas. Pada masa itu, warna lapisan air suling menjadi jingga kemerahan jika tahap pengoksidaan sampel minyak yang digunakan sangat tinggi manakala warna lapisan tersebut berwarna kuning muda sekiranya kandungan peroksida dalam sampel rendah.

Selepas itu, campuran tadi telah dititrat dengan larutan natrium tiosulfat 0.01 N yang telah siap diisi di dalam buret. Titrasi telah dilakukan dengan larutan natrium tiosulfat secara beransur-ansur dan cermat supaya tidak terlebih daripada had yang diperlukan. Di samping titrasi, kelalang kon juga telah digoncangkan dengan kuat dan berterusan supaya campuran tersebut menjadi sekata. Titrasi diteruskan sehingga warna lapisan akueus bertukar menjadi kuning muda dan ini adalah untuk memastikan semua iodin telah dibebaskan daripada lapisan kloroform. Seterusnya, 0.5 ml larutan kanji kentang 10% dimasukkan secara titisan ke dalam campuran berwarna kuning muda tadi. Pada masa ini, lapisan akueus telah menjadi warna biru keabu-abuan dan titrasi larutan natrium tiosulfat dimulakan lalu diteruskan sehingga warna biru tadi hilang dan lapisan akueus kelihatan jernih.

Seterusnya, isipadu jumlah larutan natrium tiosulfat 0.01 N yang telah digunakan dalam proses titrasi dicatat. Ujian kosong iaitu atau ujian penentuan tanpa menggunakan sampel bagi menghindarkan sebarang faktor yang boleh mempengaruhi bacaan nilai peroksida sampel yang dihasilkan daripada ujian berkenaan. Dalam kajian ini nilai ujian

kosong yang digunakan adalah 0.1 (Leong et al. 2011). Akhirnya, nilai peroksida sampel minyak dikira dengan menggunakan formula berikut :

$$\frac{(V_s - V_b)N \times 1000}{W}$$

Petunjuk:

V_s : isipadu (ml) larutan natrium tiosulfat yang digunakan

V_b : isipadu (ml) larutan natrium tiosulfat yang digunakan dalam ujian kosong

W : berat (g) sampel minyak atau lemak

N: normaliti larutan natrium tiosulfat

3.5 PENGUKURAN TEKANAN DARAH TIKUS KAJIAN

Kaedah kuf ekor telah digunakan untuk mengukur tekanan darah bagi semua tikus dalam kajian ini. Sistem pemerolehan data PowerLab (ADInstruments) digunakan bagi mendapatkan bacaan tekanan darah tersebut. Dalam proses pengambilan tekanan darah, setiap ekor tikus kajian telah didedahkan kepada cahaya matahari selama angaran masa lima minit sebelum tekanan darah diukur. Langkah ini adalah penting untuk memastikan pengaliran darah yang lancar ke bahagian ekornya dan justeru itu pengukuran tekanan darah boleh dilakukan dengan cepat serta mendapat bacaan tekanan darah dengan tepat. Selepas itu, setiap tikus yang diukur tekanan darahnya dimasukkan ke dalam bekas penahan dengan cermat supaya ia tidak mengalami kecederaan. Kuf di pasang pada bahagian ekornya dan sehelai tuala kecil diletak meliputi bahagian muka bagi menutup penglihatannya buat sementara. Langkah ini dipercayai boleh menenangkan perasaan emosinya dan bacaan tekanan darah tidak dipengaruhi faktor lain (Azlina et al. 2009). Bacaan tekanan darah bagi setiap tikus telah diambil sebanyak lima kali dan akhirnya bacaan purata diambil.

3.6 PEMROSESAN SERUM DARAH UNTUK UJIAN BIOKIMIA

Sampel darah kesemua ekor tikus diambil sebelum tikus dikorbankan pada akhir kajian. Sampel darah diambil setelah diberi inhalasi dietil ether selepas sampel darah ini diambil bagi tujuan pemeriksaan parameter antioksidan dan penanda tekanan oksidatif serum. Sampel darah yang diisi di dalam botol darah tidak bersalut dibiarkan pada suhu bilik selama dua hingga tiga jam sebelum proses pengemparan dilakukan. Proses pengemparan darah dilakukan bagi tujuan memisahkan darah dan serum. Kelajuan yang digunakan adalah 3000 r.p.m pada suhu 4°C selama 10 minit. Serum yang diperoleh seterusnya dipindahkan ke dalam tiub Appendrof bagi tujuan analisa.

3.7 PENENTUAN PARAMETER ANTIOKSIDAN DAN PENANDA TEKANAN OKSIDATIF

3.7.1 Penentuan Paras Katalase (CAT)

Ujian bagi penentuan paras CAT dalam serum darah telah dilakukan dengan mengukur kehadiran aktiviti enzim antioksida. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran C).

3.7.2 Penentuan Paras Superoksida Dismutase (SOD)

Ujian bagi penentuan paras SOD dalam serum darah telah dilakukan dengan mengukur kehadiran aktiviti enzim antioksida. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran D).

3.7.3 Penentuan Paras Glutation (GSH)

Ujian bagi penentuan paras GSH dalam serum darah telah dilakukan dengan mengukur kehadiran aktiviti enzim antioksidasi. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran E).

3.7.4 Penentuan Paras Bahan Reaktif Asid Tiobarbiturik (TBARS)

Ujian bagi penentuan paras TBARS dalam serum darah telah dilakukan dengan mengukur paras tekanan oksidatif. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran F).

3.8 PENENTUAN BERAT TISU JANTUNG

Pada akhir tempoh kajian iaitu 24 minggu, semua tikus telah dibunuh dan tisu jantung yang diambil bagi setiap tikus telah ditimbang menggunakan penimbang digital.

3.9 PEMROSESAN TISU JANTUNG UNTUK UJIAN BOKIMIA

Pada akhir tempoh kajian iaitu 24 minggu, semua tikus telah dibunuh dan tisu jantung yang diambil bagi setiap tikus telah dibasuh dengan normal salina sebelum ia dibungkus dengan kerajang aluminium. Tisu jantung yang telah diproses itu telah diletak dalam kotak ais dan akhirnya disimpan dalam peti sejuk dengan suhu -70°C sebelum ia digunakan.

Tisu jantung telah dihomogenat mengikut arahan dalam kit yang digunakan dalam kajian ini. Setelah tisu jantung dikeluarkan daripada -70°C , 25 mg tisu ditimbang dan dimasukkan ke dalam tiub pengempar yang diisi dengan biji besi (*OMNI metal bead*). Kemudian, penampunan RIPA bersama koktail perencat *protease* sebanyak 250 μL ditambahkan dalam tisu jantung tadi dan dihomogenkan menggunakan mesin homogen

Omni Bed ruptor 24, selama 10 saat sekali untuk dua pusingan. Setelah itu, dengan menggunakan mesin pengempar, tiub tersebut telah diemparkan pada 3821 x 1000 r.p.m selama 10 minit dengan suhu 4°C. Selepas itu, supernatan telah diambil daripada tiub pengempar dan digunakan untuk analisa paras kit asai.

3.10 PENENTUAN PARAMETER BIOKIMIA DALAM TISU JANTUNG

3.10.1 Penentuan Paras Protein C-Reaktif (CRP)

Ujian bagi penentuan paras CRP dalam tisu jantung telah dilakukan dengan mengukur paras inflamasi. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran G).

3.10.2 Penentuan Paras Faktor- α Nekrosis Tumor (TNF- α)

Ujian bagi penentuan paras TNF- α dalam tisu jantung telah dilakukan dengan mengukur paras inflamasi. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran H).

3.10.3 Penentuan Paras troponin

Ujian bagi penentuan paras troponin dalam tisu jantung telah dilakukan dengan mengukur paras aktiviti biokimia jantung. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran I).

3.10.4 Penentuan Paras Laktat Dehidrogenase (LDH)

Ujian bagi penentuan paras LDH dalam tisu jantung telah dilakukan dengan mengukur paras aktiviti biokimia jantung. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran J).

3.10.5 Penentuan Paras Asid Lemak Bebas (FFA)

Ujian bagi penentuan paras FFA dalam tisu jantung telah dilakukan dengan mengukur paras kandungan lipid jantung. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran K).

3.10.6 Penentuan Paras Trigliserida (TG)

Ujian bagi penentuan paras TG dalam tisu jantung telah dilakukan dengan mengukur paras kandungan lipid jantung. Penyediaan larutan dan reagen berserta prinsip pengukuran dan langkah perlakuan asai telah dijalankan berdasarkan kepada panduan arahan yang terdapat dalam kit asal yang telah digunakan (Lampiran L).

3.11 PEMROSESAN TISU JANTUNG UNTUK HISTOLOGI

Setelah tikus dibunuh, tisu jantung diambil. Tisu jantung telah dibersihkan dengan membuang lemak serta tisu yang melekat padanya. Ventrikel kiri jantung telah dipotong dan difiksasi dengan larutan formalin berpenimbal fosfat 10% tidak melebihi 24 hingga 48 jam.

Pemrosesan tisu peringkat penyahidratan, pencerahan dan infiltrasi serta impregnasi telah dilakukan dengan menggunakan mesin pemroses tisu automatik, Microm STP1201-1 Tissue Processor (Lampiran M).

Pemrosesan tisu diteruskan dengan pemrosesan blok. Tisu jantung (ventrikel kiri) pula, ia diletakkan secara mendatar ke acuan pembedaan dan diisi dengan lilin. Kemudian blok tisu dengan lilin parafin diletakkan di atas permukaan ais dan acuan pembedaan dikeluarkan setelah ia dibeku. Akhirnya, blok tisu yang dihasilkan disimpan pada suhu 0°C sehingga proses penghirisan tisu dilakukan.

Tisu telah dihiris dengan ketebalan 5µm menggunakan mesin mikrotom. Sebelum memulakan proses hirisan, blok tisu telah disejukkan supaya proses hirisan dijalankan dengan mudah dan juga bagi mendapatkan hasil hirisan yang baik. Setelah dihiris, tisu yang berupa dalam bentuk lilin diampai di atas air suling yang telah dipanaskan pada suhu 50°C. Seterusnya, hirisan reben yang terampai, dipancing pada permukaan air dengan menggunakan slaid kaca. Dua keratan tisu dipancing pada satu slaid yang sama. Pada masa yang sama, hirisan reben telah dipastikan supaya tidak terlalu lama dibiarkan terampai dalam air suling kerana hirisan tersebut boleh merekah atau pecah. Selepas itu, slaid yang terlekat dengan tisu dikeringkan di atas rak sehingga kebanyakan air pada slaid telah tiada dan seterusnya diletakkan di atas plat pemanasan yang bersuhu 40°C selama semalaman. Ini akan membantu mengeringkan slaid tisu yang telah dihasilkan. Kemudian, slaid yang telah kering disimpan dalam kotak slaid yang disediakan sehingga ia diwarnakan. Bagi pewarnaan histologi, tisu jantung pada slaid kaca biasa. Carta aliran kaedah pemrosesan tisu jantung telah digambarkan dalam Lampiran M.

3.11.1 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Salah satu jenis teknik pewarnaan yang umum dan sering menjadi pilihan penyelidik adalah pewarnaan hematoksilin dan eosin (H&E). Teknik pewarnaan ini sering digunakan sebagai rutin dalam kajian mikroskopi. Penggunaan kedua-dua pewarnaan tersebut, memudahkan pengguna dalam menentukan morfologi dan perubahan patologi pada tisu yang dikaji. Justeru itu, hemaktosilin yang memberi warna ungu mempunyai afiniti kepada unsur basofilik seperti DNA dan RNA yang didapati dalam nukleus. Pewarnaan eosin pula menunjukkan afiniti terhadap unsur asidofilik seperti sitoplasma dan struktur lainintrasel lalu mewarnakannya dengan warna merah jambu.

Langkah penyahilinan (*dewaxing*) adalah permulaan dalam proses pewarnaan tisu. Slaid tisu (ventrikel kiri) disusun dalam rak slaid besi dan direndam dalam larutan xilena 100% berturut-turut sebanyak dua kali untuk tempoh masa selama lima minit bagi setiap kali. Proses ini diteruskan ke langkah penghidratan dengan memasukkan slaid ke dalam larutan alkohol 100% I, 100% II, 95%, 80%, 70% dan 50% mengikut urutan selama tiga minit dalam setiap larutan.

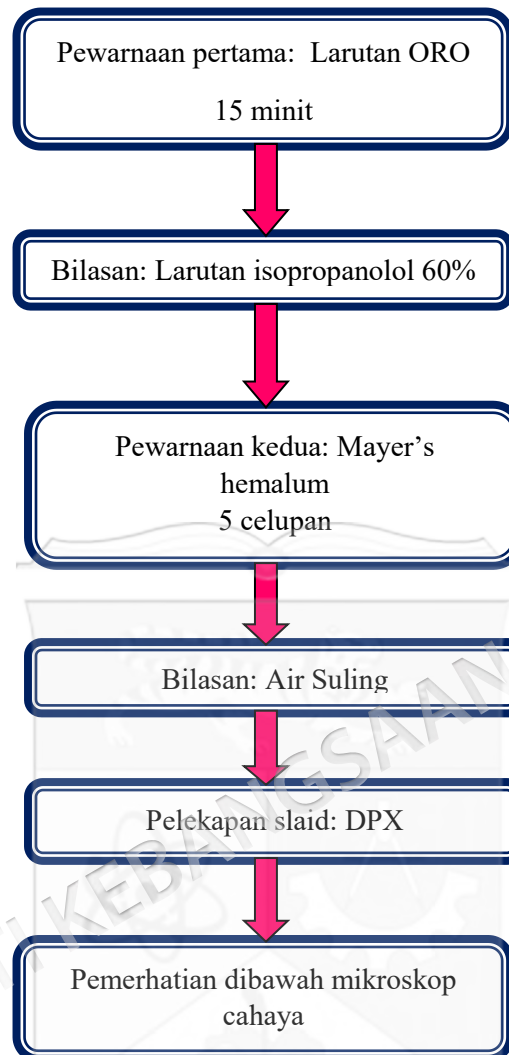
Selepas slaid tisu dikeluarkan daripada larutan alkohol 50%, ia dibawa ke air paip mengalir dan dibiarkan dalam air selama satu minit. Kemudian, slaid tisu diletakkan dalam larutan pewarna hematoksilin yang telah disediakan (Lampiran N) selama sepuluh hingga lima belas minit dan selepas itu, slaid dilalukan dibawah air paip yang mengalir sehingga slaid bersih daripada warna hematoksilin. Setelah itu, slaid dicelupkan dalam larutan asid alkohol 1% (1% asid alkohol disediakan dengan campuran antara 99 ml alkohol 70% dan 1 ml asid hidroklorik berkonsentrasi tinggi) sebanyak tiga celupan atau selama tiga saat bagi proses pembezaan. Setelah langkah ini, slaid diletakkan di bawah air paip yang mengalir sekali lagi selama lima hingga sepuluh minit bagi proses pembiruan. Kemudian, slaid dimasukkan ke dalam larutan pewarna eosin (Lampiran O) selama tiga hingga lima minit bagi tujuan pembalasan warna.

Sejurus selepas slaid dikeluarkan daripada pewarnaan eosin, bermulalah langkah penyahidratan. Pada masa ini, slaid dimasukkan ke dalam alkohol 95% I, 95% II, larutan alkohol 100% I dan larutan alkohol 100% II selama lima minit bagi setiap larutan xilena. Slaid dikeluarkan daripada larutan xilena 100% II dan diteruskan dengan proses pelekapan di mana slaid tisu ditutup dengan penutup slaid (*cover slip*) selepas larutan DPX dititiskan di atas slaid tisu. Pada masa ini, gelembung udara yang terperangkap di bawah penutup slaid dipastikan tiada supaya slaid tisu yang terhasil adalah bersih dan terang dibawah penglihatan penganalisa imej. Kemudian, semua slaid tersebut dibiarkan kering pada suhu bilik selama semalaman. Penganalisan mikroskopi menggunakan mikroskop cahaya pada kanta mata tahap pembesaran 10X dankanta objektif pada tahap pembesaran 4X, 10X, 20X, dan 40X dilakukan oleh dua orang penyelidik. Pengukuran kelebaran kardiomiometer dan saiz nukleus pada tisu miokardium telah dijalankan. Carta aliran bagi proses pewarnaan H&E telah ditunjukkan di Lampiran Q

3.11.2 Pewarnaan *Oil-Red-O*

Oil-Red-O adalah salah satu pewarnaan yang digunakan bagi kajian pemerhatian lipid pada tisu. Larutan stok *Oil-Red-O* (ORO) disediakan dengan melarutkan 0.5 g ORO ke dalam 100 mL isopropanolol. Larutan ini dikacau di atas plat pemanas semalaman. Kemudian, larutan ini ditapis dengan menggunakan kertas turas dan hasil tapisan disimpan di dalam peti sejuk bersuhu 4°C sehingga digunakan. Larutan ORO disediakan sejeurus sebelum pewarnaan dilakukan. Tiga puluh mL larutan stok ORO diambil dan dicampurkan dengan 20mL air suling. Larutan Mayer's hemalum dilakukan dengan melarutkan hematoksilin 1 g, potassium alum 50 g, sodium iodat 0.2 g, kloral hidrat 50 g dan asid sitrik 1 g dilarutkan di dalam 1000mL air suling. Larutan isopropanolol 60% disediakan dengan mencampurkan 60mL isopropanolol dengan 40mL air suling.

Pewarnaan pertama dilakukan dengan meletakkan slaid di dalam larutan ORO selama 15 minit. Selepas itu bilasan dilakukan dengan larutan isopropanolol 60%. Proses pewarnaan kedua dilakukan dengan mencelupkan slaid di dalam larutan Mayer's hemalum sebanyak 5 celupan. Kemudian, slaid dibilas hingga bersih dengan menggunakan air suling. Pelekapan slaid dilakukan dengan medium DPX dan ditutup dengan penutup slaid. Slaid sedia dilihat di bawah mikroskop cahaya. Carta aliran bagi proses pewarnaan ORO telah ditunjukkan dalam Rajah 3.2



Rajah 3.2 : Carta aliran pewarnaan ORO

3.12 KAJIAN MORFOMETRI JANTUNG

Morfomeri jantung yang telah dikaji adalah kelebaran kardiomyofiber, saiz nukleus kardiomyofiber dan jumlah kiraan nukleus kardiomyofiber pada lapisan tisu miokardium ventrikel kiri. Tisu jantung telah diwarnakan dengan H&E bagi kajian morfometri ini. Imej tisu jantung telah diambil (format JPEG, warna 24-bit, 2560x1920 piksel) dengan menggunakan kamera MicroPublisher 5.0 RTV yang disambungkan ke mikroskop. Pembesaran pada 200X telah dilakukan dan lima hirisan tisu jantung yang diambil secara rawak bersistem mengikut turutan. Pengukuran kelebaran kardiomyofiber dan saiz nukleus pada tisu miokardium ventrikel kiri telah dilakukan mengikut kaedah yang telah dihuraikan oleh pengkaji terdahulu (Owu et al. 1998) dengan sedikit penyesuaian. Proses segmentasi telah dilakukan pada imej tisu tersebut melalui program perisian penganalisa imej "Image-Pro Plus: versi 7.0 (Media Cybernetics Inc., USA). Nukleus yang pada asalnya diwarnakan ungu oleh pewarnaan H&E, telah ditandakan dengan warna hitam manakala warna putih telah digunakan bagi menandakan bahagian tisu lapisan miokardium yang lain dalam proses segmentasi.

Bagi pengukuran kelebaran kardiomyofiber dan saiz nukleusnya, satu tapak pengukuran bersaizkan $10,000 \mu\text{m}^2$ telah dikenalpasti lalu ditentukan sebagai piawaian bagi mengelakkan kepincangan dalam keputusan antara sampel menggunakan grid 3 x 3. Di samping itu, bagi setiap potongan tisu jantung, empat ukuran dilakukan iaitu pada kedudukan 0° , 90° , 180° dan 270° . Morfometri tisu jantung telah ditentukan dengan menggunakan program perisian penganalisa imej "Image-Pro Plus" versi 7.0 (Media Cybernetics Inc, USA) dan telah dipastikan bahawa kalibrasi yang betul dilakukan pada imej sebelum menjalankan pengukuran. Dua belas bacaan diambil daripada setiap sampel tisu jantung untuk menentukan purata lalu mendapat satu bacaan dengan menggunakan formula seperti dibawah :

$$\text{Diameter} = 2r = 1.048 \times \text{MB}$$

Petunjuk :

MB = *myocyte breadth*

Pengiraan jumlah nukleus kardiomyofiber pula menggunakan formula seperti :

$$N(n)v = N(n)A/Dn$$

$$N(n)T = N(n)v \times VT$$

Petunjuk:

$N(n)v$ = Nukleus miosit per unit isipadu miokardium

$N(n)T$ = Jumlah bilangan nukleus miosit dalam setiap ventrikel

$N(n)A$ = Jumlah purata nukleus

VT = Jumlah isipadu ventrikular miokardium yang kelihatan

Dn = Purata panjang nukleus

3.13 ANALISIS STATISTIK

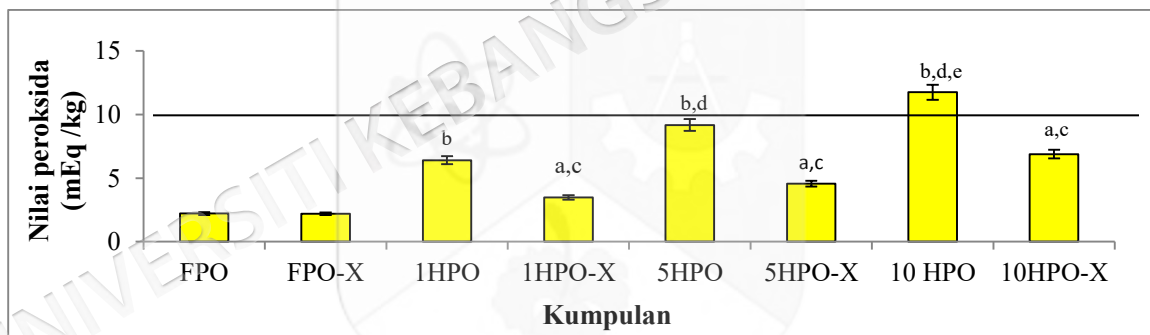
Data dinyatakan sebagai nilai purata \pm ralat piawai (SEM). Memandangkan jumlah sampel adalah kurang daripada lima puluh, maka ujian Shapiro-Wilk telah digunakan bagi penentuan normaliti taburan data. Bagi tekanan darah yang diukur, analisis dilakukan adalah menggunakan ujian t berpasangan (*paired t-test*). Perbandingan perbezaan antara kumpulan kajian, analisis perbezaan (*Analysis of Variance, ANOVA*) telah digunakan dan ianya diikuti dengan ujian *Post Hoc* bagi ujian ANOVA yang telah menunjukkan perbezaan kumpulan. Kesignifikan setiap keputusan ujian telah ditentukan berdasarkan nilai $p < 0.05$ dan perisian pakej statistik bagi sains social (*Statistical Package For Social Science, SPSS*) versi 20.0 telah digunakan bagi kesemua analisa data dalam kajian ini.

BAB IV

HASIL KAJIAN

4.1 NILAI PEROKSIDA

Terdapat peningkatan nilai peroksida bagi minyak sawit yang dipanaskan sekali, lima kali dan sepuluh kali berbanding minyak sawit segar. Nilai peroksida minyak sawit yang dipanaskan sekali, lima kali dan sepuluh kali jauh lebih rendah dengan penambahan ADD-X berbanding minyak sawit segar dan kumpulan tanpa penambahan ADD-X.



Rajah 4.1: Nilai peroksida (meq/kg) dalam minyak sawit segar (FPO) yang dipanaskan tanpa dan dengan ADD-X (purata \pm SEM (n=6)). Perbezaan signifikan pada nilai $p < 0.05$ apabila dibandingkan dengan kumpulan masing-masing. Garis melintang menunjukkan nilai maksimum peroksida minyak yang dibenarkan dalam diet mengikut 'American Oil Chemists' Society' (AOCS, 2003).

a = berbeza dengan signifikan berbanding dengan 1HPO, 5HPO, 10HPO masing-masing ($p < 0.05$)

b = berbeza dengan signifikan berbanding dengan FPO ($p < 0.05$)

c = berbeza dengan signifikan berbanding dengan FPO-X ($p < 0.05$)

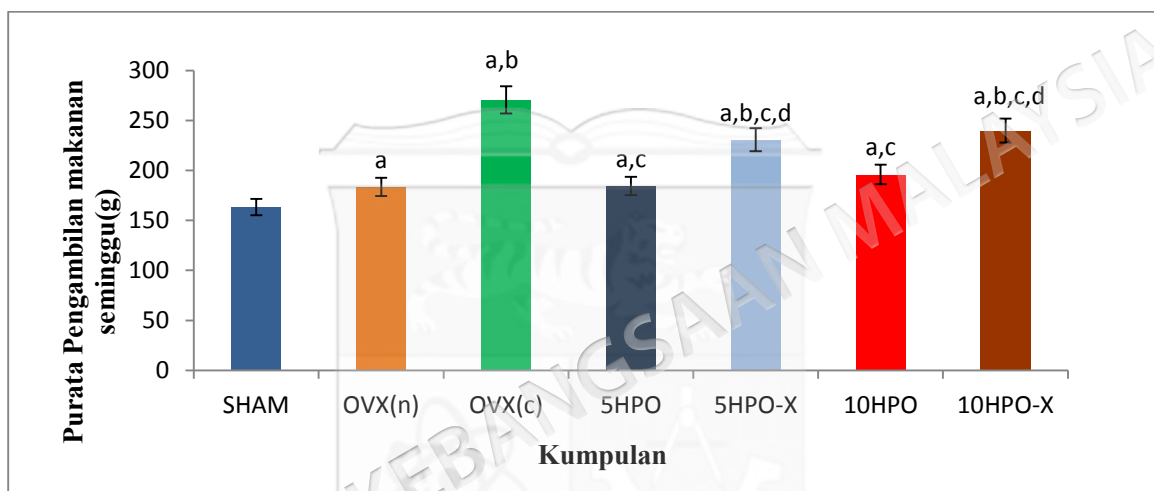
d = berbeza dengan signifikan berbanding dengan 1HPO ($p < 0.05$)

e = berbeza dengan signifikan berbanding dengan 5HPO ($p < 0.05$)

4.2 PERTUMBUHAN TIKUS DAN PENGAMBILAN MAKANAN

4.2.1 Purata Pengambilan Makanan Seminggu

Purata pengambilan makanan seminggu kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO, 10HPO-X adalah signifikan berbanding dengan kumpulan SHAM (Rajah 4.3). Pemberian ADD-X meningkatkan pengambilan makanan kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding kumpulan 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.2: Purata pengambilan makanan seminggu oleh tikus dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

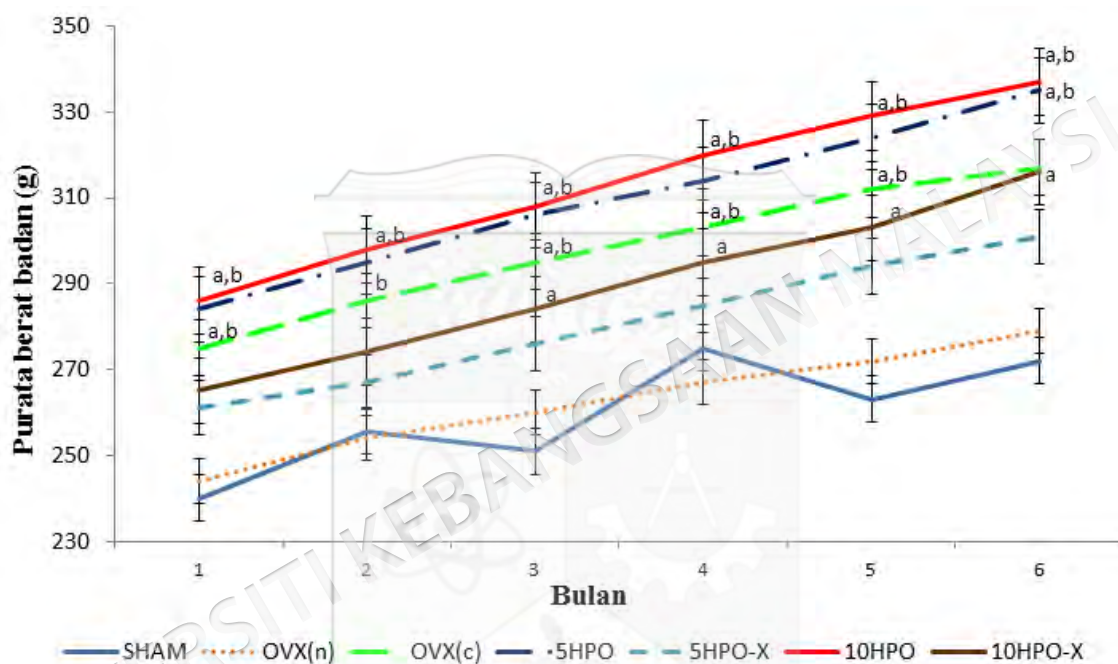
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.2.2 Berat Badan Tikus

Terdapat peningkatan berat badan bagi kesemua kumpulan dalam kajian ini berbanding berat badan asal. Walau bagaimanapun, peningkatan purata berat badan adalah jauh lebih tinggi bagi kumpulan 10HPO pada setiap bulan dengan signifikan berbanding kumpulan SHAM dan OVX(n) (Rajah 4.2).



Rajah 4.3: Purata berat badan tikus dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

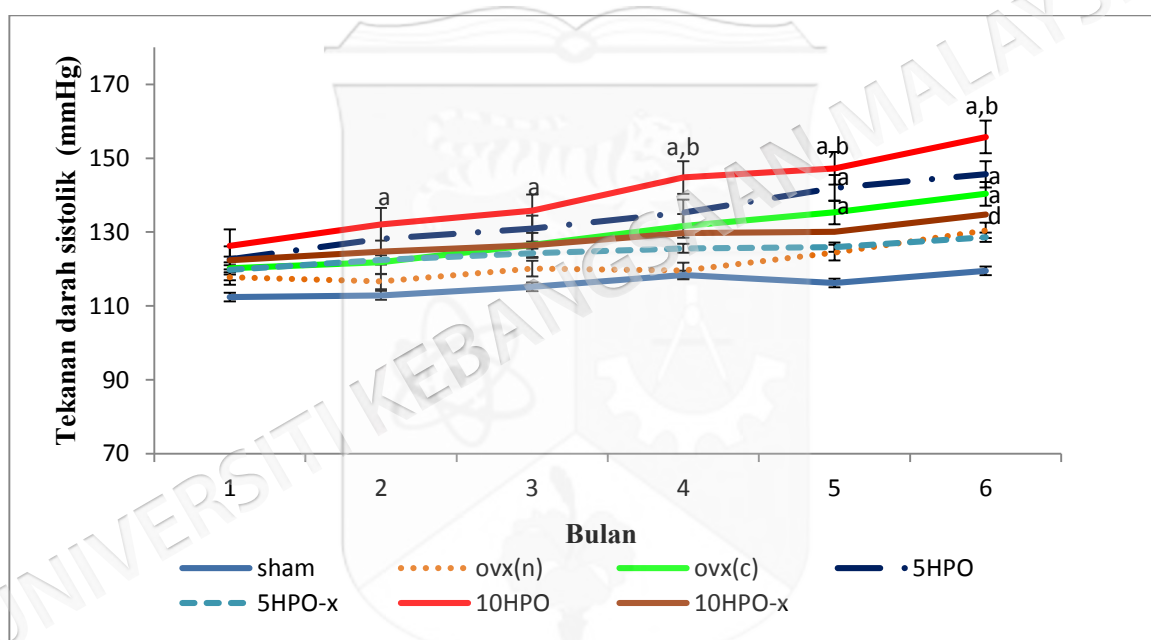
a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

4.3 TEKINAN DARAH

4.3.1 Tekanan Darah Sistolik

Terdapat peningkatan signifikan ($p < 0.05$) tekanan darah sistolik pada akhir kajian bagi kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO jika dibandingkan dengan tekanan darah pada awal kajian kumpulan masing-masing. Peningkatan tekanan darah sistolik adalah lebih rendah secara signifikan ($p < 0.05$) bagi kumpulan 10HPO-X berbanding 10HPO (Rajah 4.4)



Rajah 4.4: Perbezaan tekanan darah sistolik dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

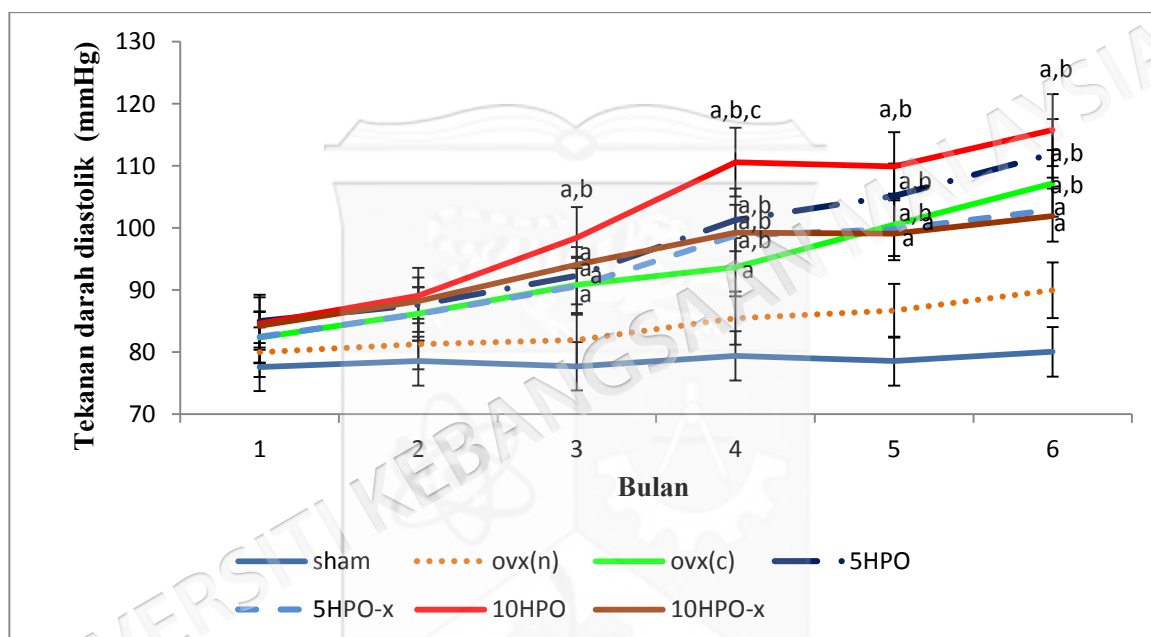
a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5 HPO /10HPO masing-masing

4.3.2 Tekanan Darah Diastolik

Terdapat peningkatan signifikan ($p < 0.05$) tekanan darah diastolik pada akhir kajian bagi kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO jika dibandingkan dengan tekanan darah pada awal kajian kumpulan masing-masing. Peningkatan tekanan darah diastolic adalah lebih rendah secara signifikan ($p < 0.05$) bagi kumpulan, 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding SHAM (Rajah 4.5).



Rajah 4.5: Perbezaan tekanan darah diastolic dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

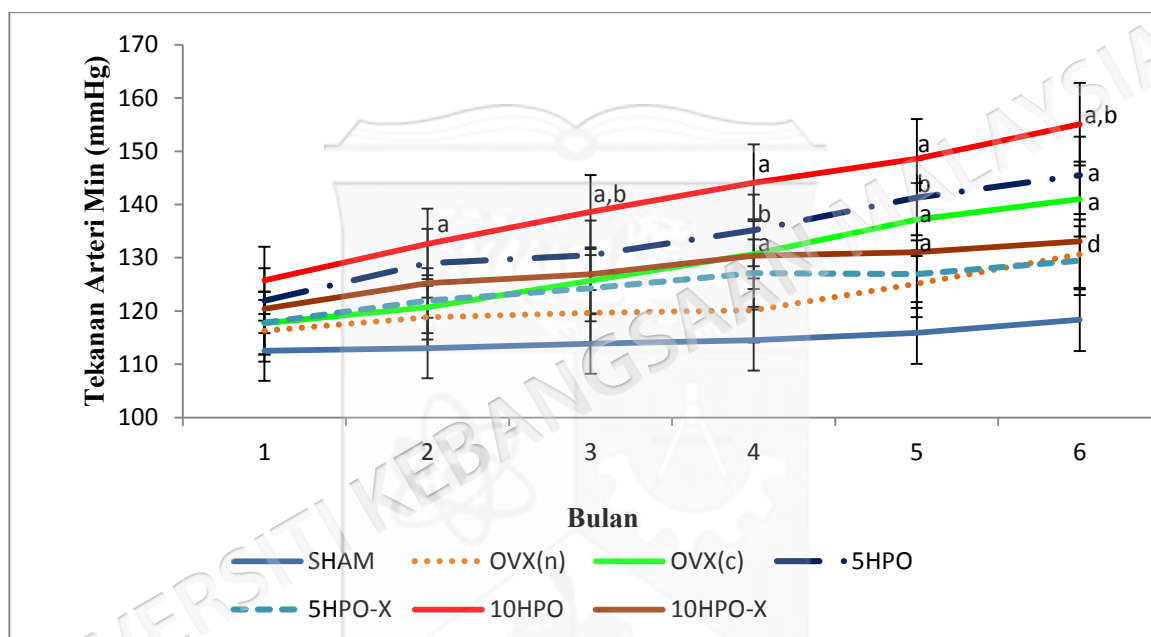
a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

4.3.3 Tekanan Darah Min

Terdapat peningkatan signifikan ($p < 0.05$) min tekanan darah bagi kumpulan pada akhir kajian bagi kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO jika dibandingkan dengan tekanan darah pada awal kajian kumpulan masing-masing. Peningkatan tekanan min darah adalah lebih rendah secara signifikan ($p < 0.05$) bagi kumpulan 10HPO-X berbanding 10HPO (Rajah 4.6)



Rajah 4.6: Perbezaan tekanan darah min dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

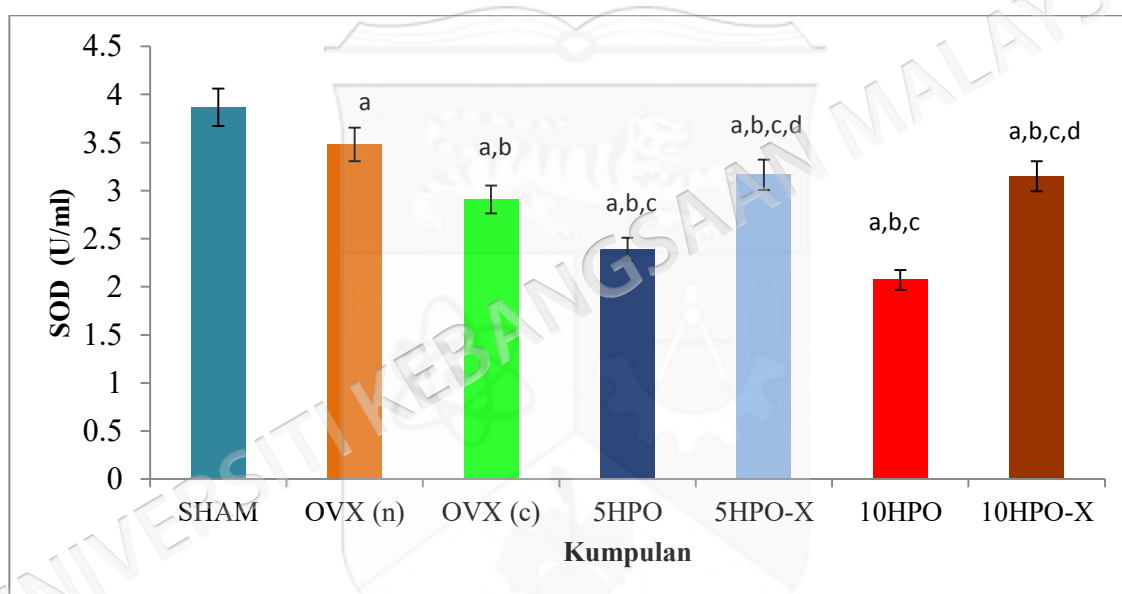
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.4 PARAS PARAMETER ANTIOKSIDAN DAN PENANDA OKSIDATIF

4.4.1 Paras Aktiviti Enzim Superoksida Dismutase (SOD)

Hasil kajian ini telah mendapati paras SOD dalam serum tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan 5HPO dan 10HPO menurunkan paras SOD secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM, OVX (n) dan OVX (c). Pemberian ADD-X meningkatkan paras SOD bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.7: Paras SOD serum dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariektomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariektomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

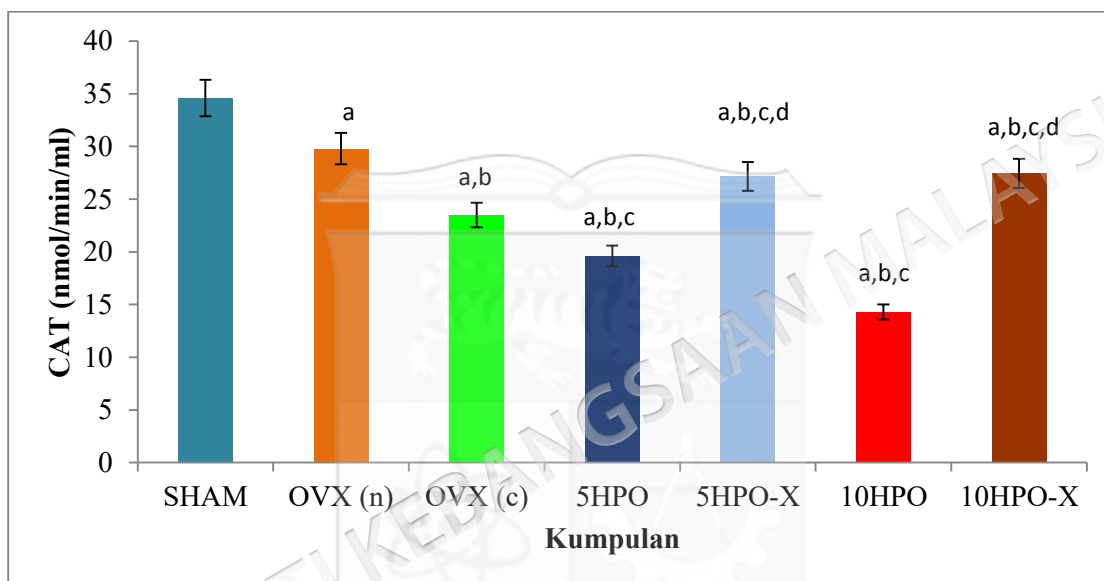
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.4.2 Paras Aktiviti Enzim Katalase (CAT)

Hasil kajian ini telah mendapati paras CAT dalam serum tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan 5HPO dan 10HPO menurunkan paras CAT secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM, OVX (n) dan OVX (c). Pemberian ADD-X meningkatkan paras CAT bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.8: Paras CAT serum dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

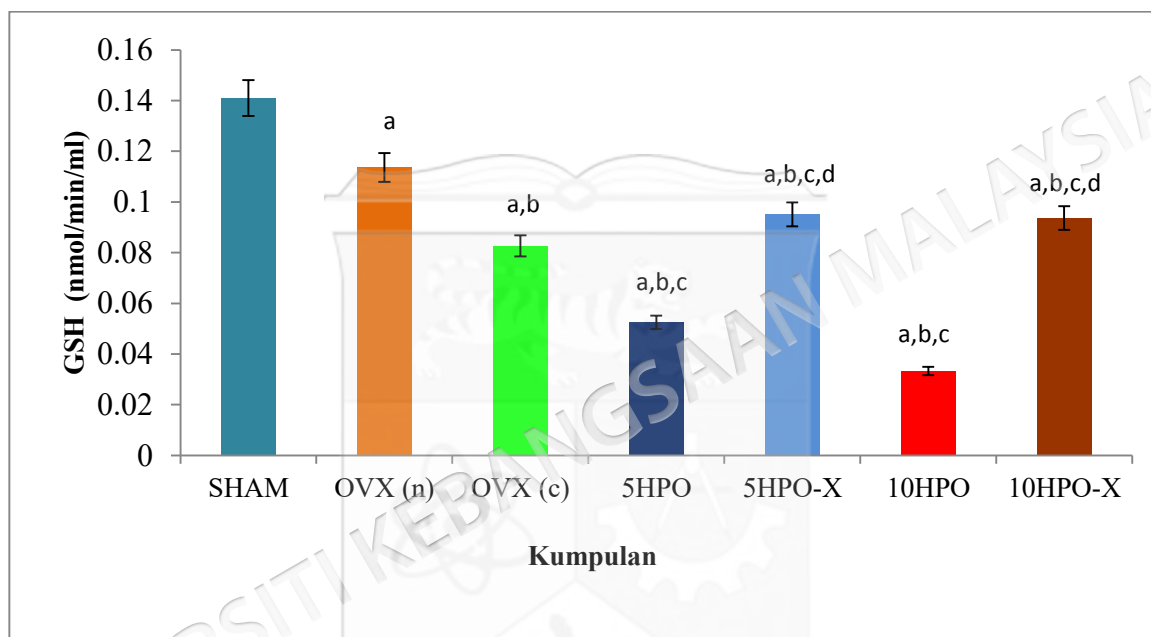
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.4.3 Paras Aktiviti Enzim Glutation (GSH)

Hasil kajian ini telah mendapati paras GSH dalam serum tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan 5HPO dan 10HPO menurunkan paras GSH secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM, OVX (n) dan OVX (c). Pemberian ADD-X meningkatkan paras GSH bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.9: Paras GSH serum dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

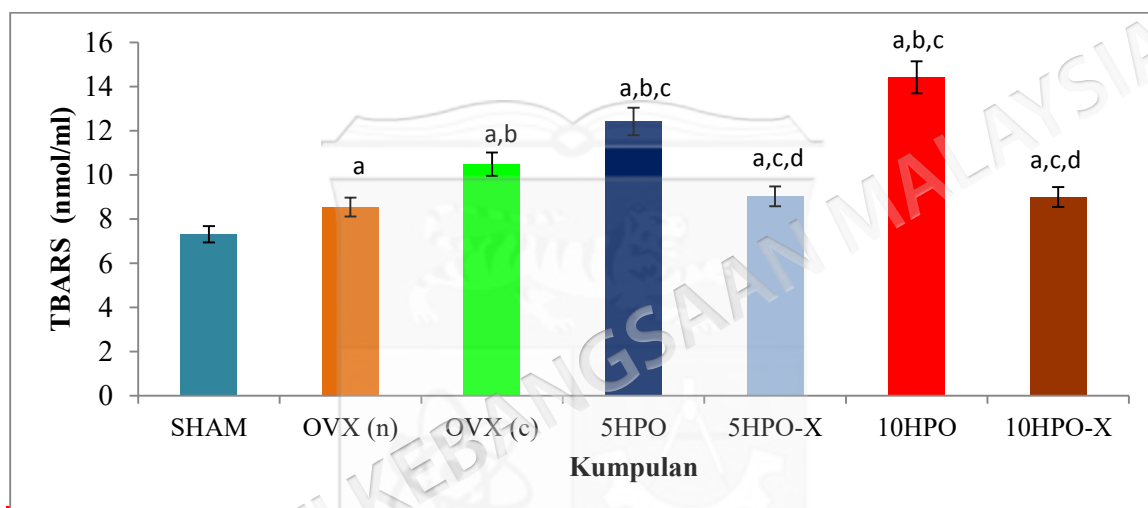
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.4.4 Paras Bahan Reaktif Asid Tiobarbiturik (TBARS)

Hasil kajian ini telah mendapati paras TBAR dalam serum tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO menunjukkan peningkatan paras TBAR secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM dan OVX (n). Pemberian ADD-X menurunkan paras TBAR bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.10: Paras TBAR serum dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

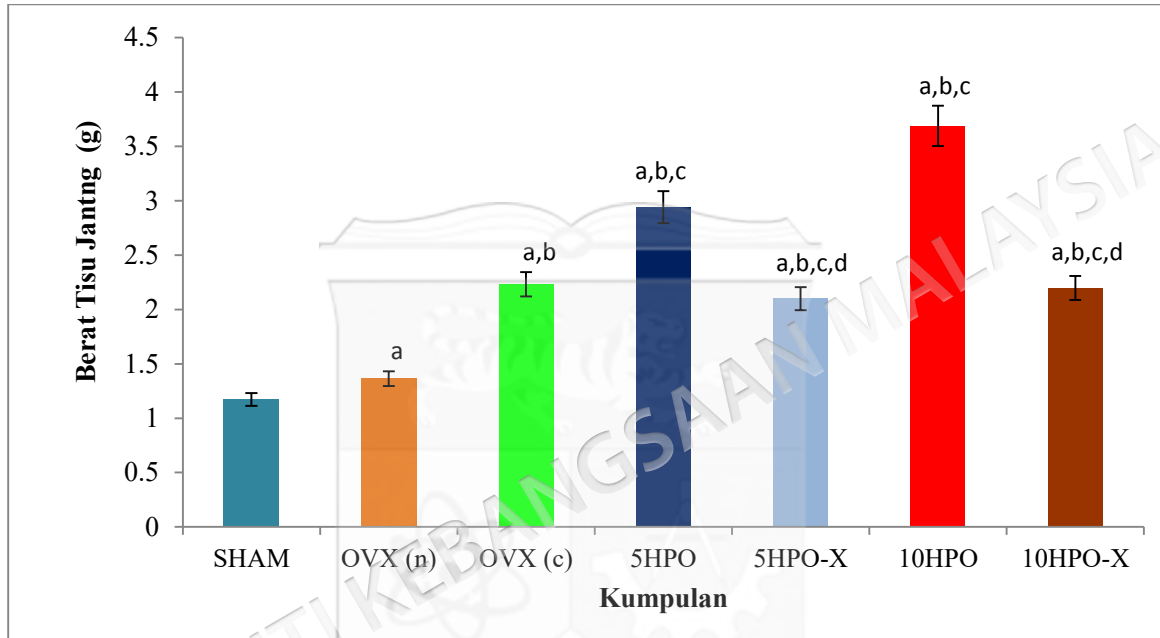
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.5 BERAT TISU JANTUNG

Hasil kajian ini telah mendapati terdapat penurunan berat jantung secara signifikan ($p < 0.05$) bagi kumpulan haiwan yang diberi ADD-X. Tetapi kumpulan haiwan OVX(c), 5HPO dan 10HPO menunjukkan peningkatan signifikan ($p < 0.05$) pada berat tisu jantung berbanding kumpulan SHAM dan OVX(n).



Rajah 4.11: Berat tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

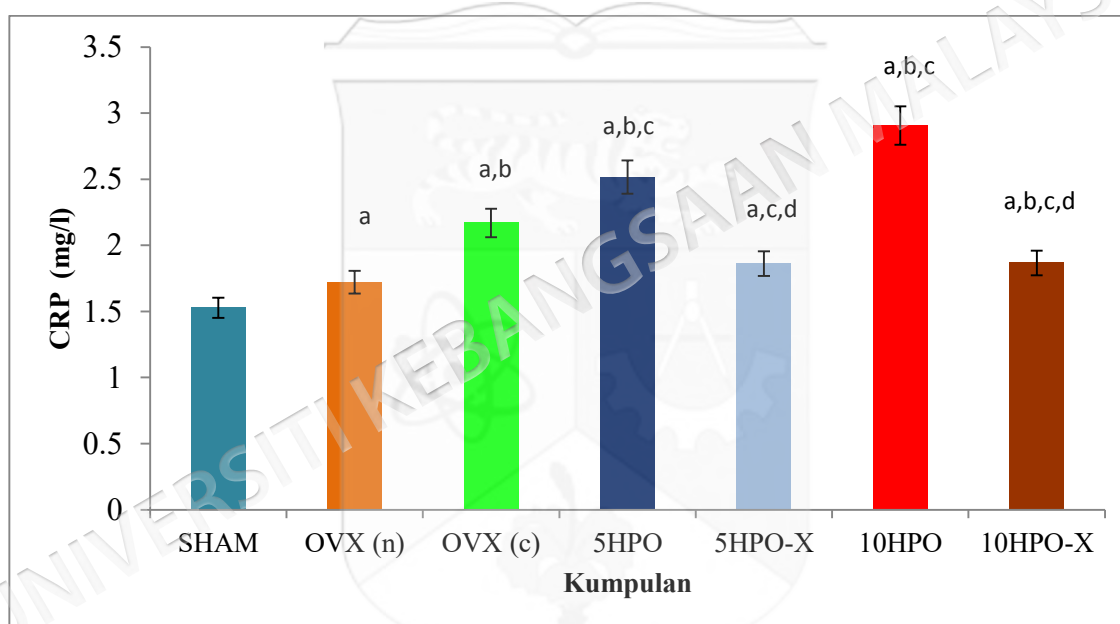
c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.6 PENANDA INFLAMASI

4.6.1 Paras Protein C-Reaktif (CRP)

Hasil kajian ini telah mendapati paras CRP dalam tisu jantung tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO menunjukkan peningkatan paras CRP secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM dan OVX (n). Pemberian ADD-X menurunkan paras CRP bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.12: Paras CRP tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariektomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariektomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM ($n=6$).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

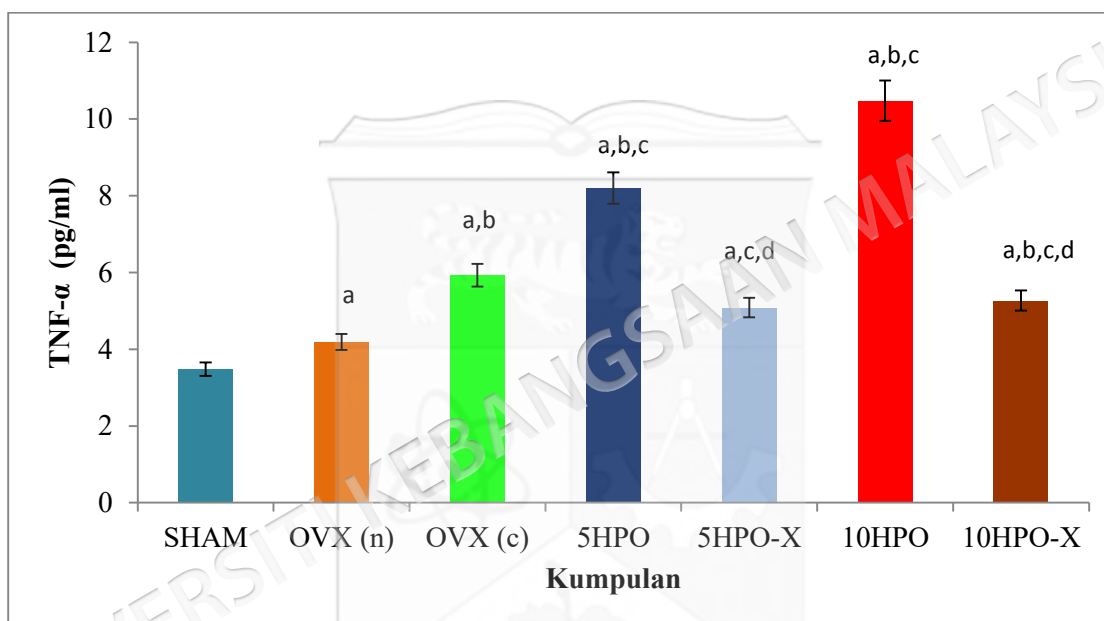
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO/ 10HPO masing-masing

4.6.2 Paras Faktor- α Nekrosis Tumor (TNF- α)

Hasil kajian ini telah mendapati paras TNF- α dalam tisu jantung tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO menunjukkan peningkatan paras TNF- α secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM dan OVX (n). Pemberian ADD-X menurunkan paras TNF- α bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.13: Paras TNF- α tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

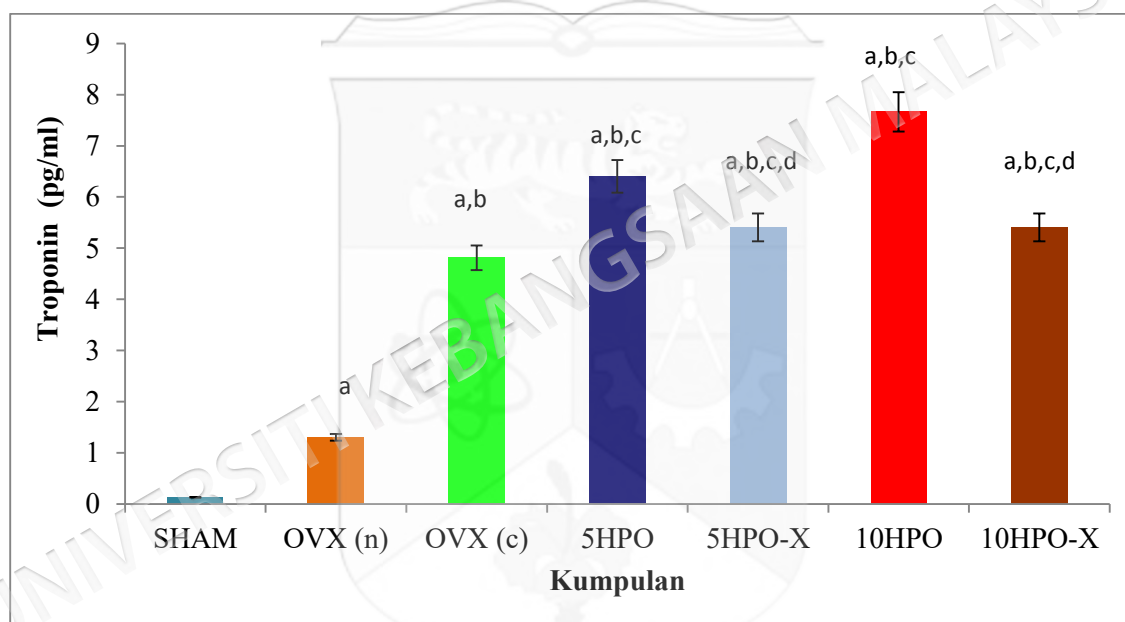
c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.7 PENANDA BIOKIMIA JANTUNG

4.7.1 Paras Troponin

Hasil kajian ini telah mendapati paras troponin dalam kesemua tisu jantung tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO menunjukkan peningkatan paras troponin secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM, OVX (n). Pemberian ADD-X menurunkan paras troponin bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.14: Paras troponin tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

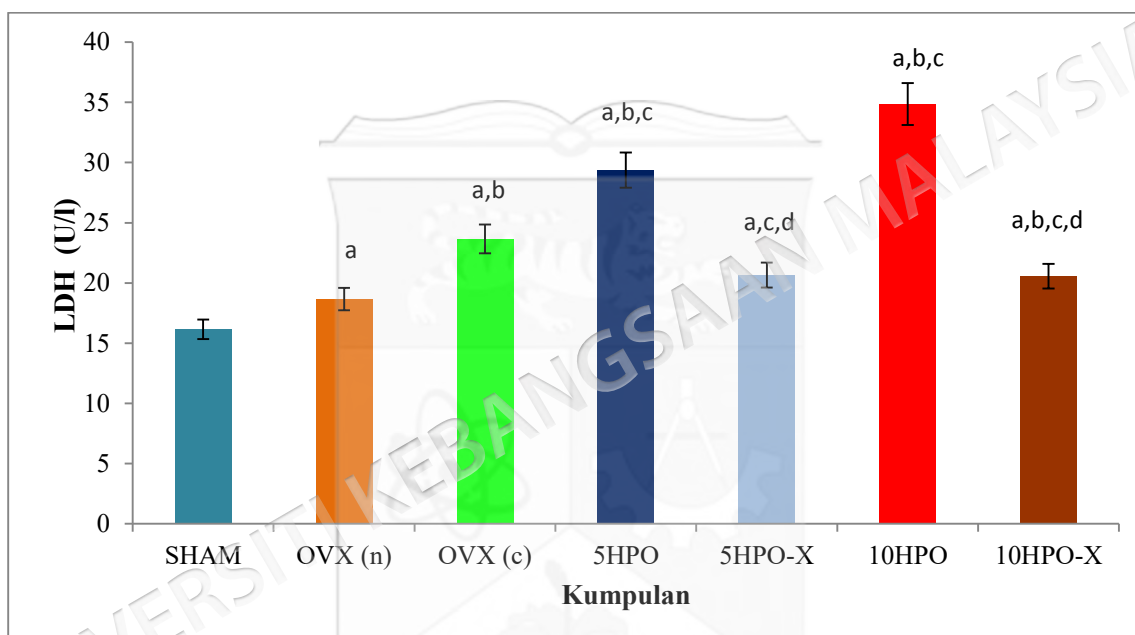
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO/ 10HPO masing-masing

4.7.2 Paras Laktat Dehidrogenase (LDH)

Hasil kajian ini telah mendapati paras LDH dalam kesemua tisu jantung tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO menunjukkan peningkatan paras LDH secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM dan OVX (n). Pemberian ADD-X menurunkan paras LDH bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.15: Paras LDH tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM ($n=6$).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

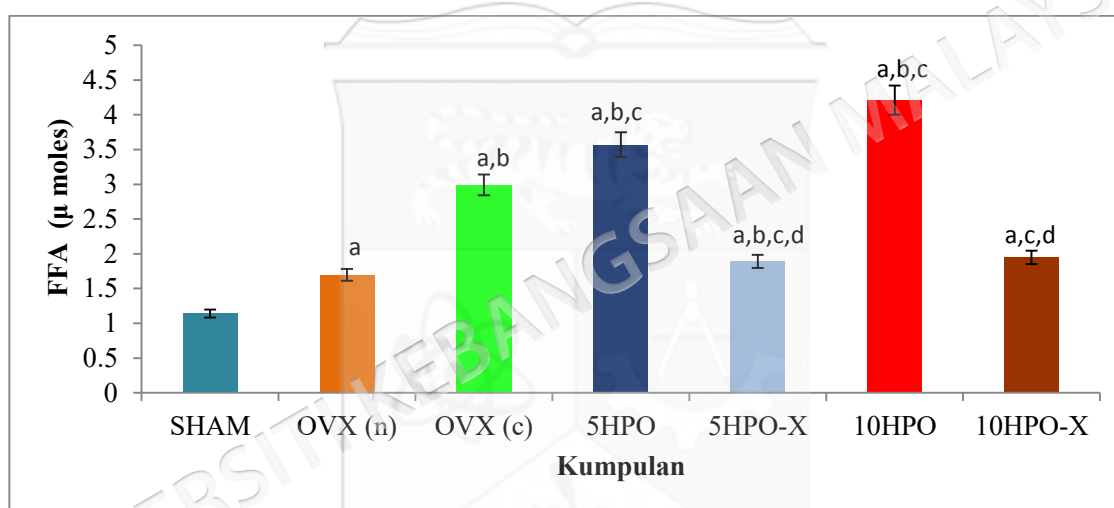
c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.8 KANDUNGAN LIPID JANTUNG

4.8.1 Paras Asid Lemak Bebas (FFA)

Hasil kajian ini telah mendapati paras FFA dalam tisu jantung tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO menunjukkan peningkatan paras FFA secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM dan OVX (n). Pemberian ADD-X menurunkan paras FFA bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.16: Paras FFA tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariektomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariektomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

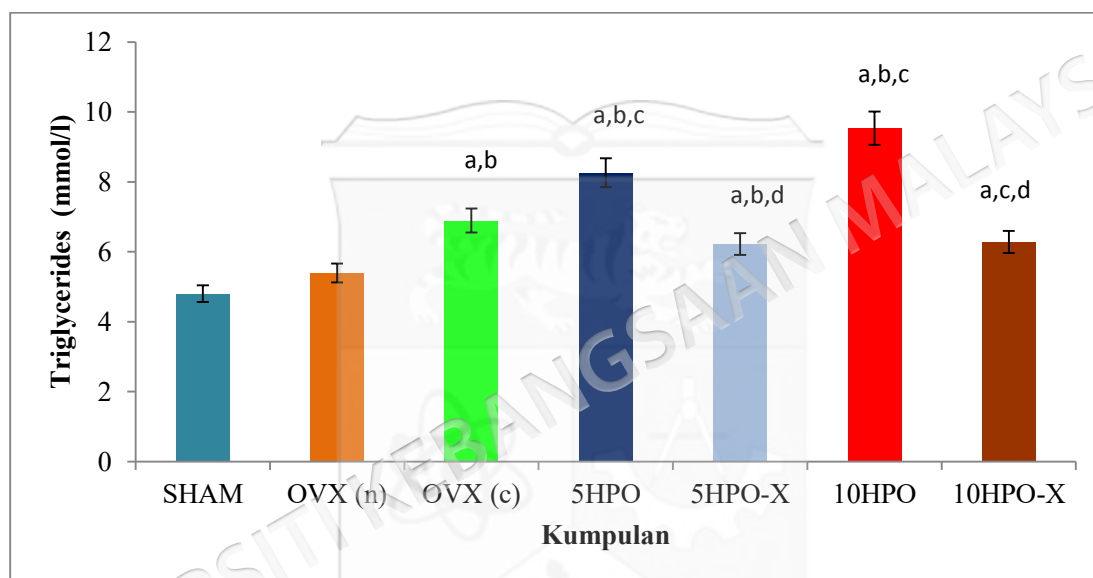
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.8.2 Paras Trigliserida (TG)

Hasil kajian ini telah mendapati paras TG dalam tisu jantung tikus kumpulan 5HPO, 5HPO-X, 10HPO dan 10HPO-X adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan SHAM. Kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO menunjukkan peningkatan paras TG secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan SHAM dan OVX (n). Pemberian ADD-X menurunkan paras TG bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X berbanding 5HPO dan 10HPO.



Rajah 4.17: Paras TG tisu jantung dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariektomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariektomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

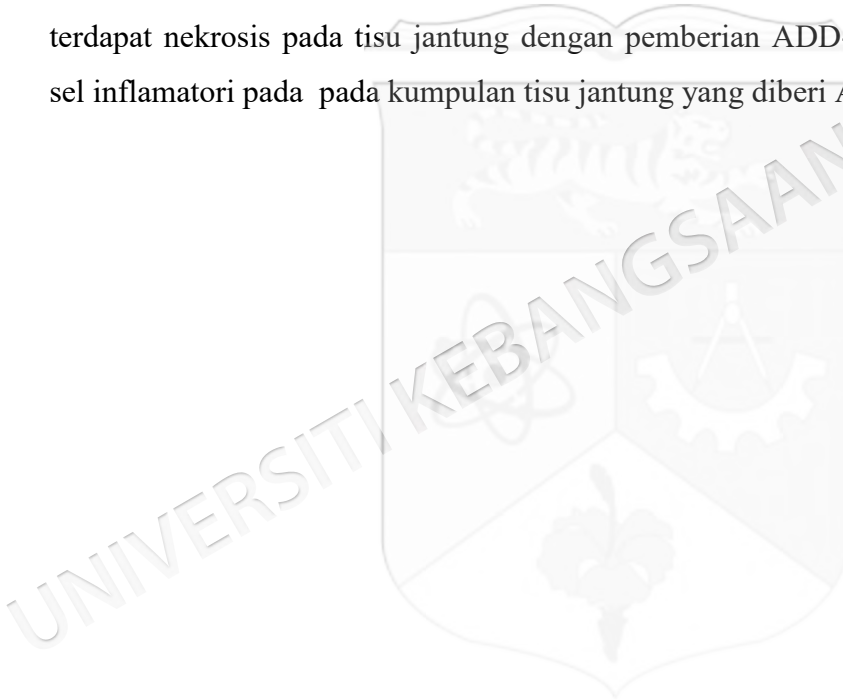
c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

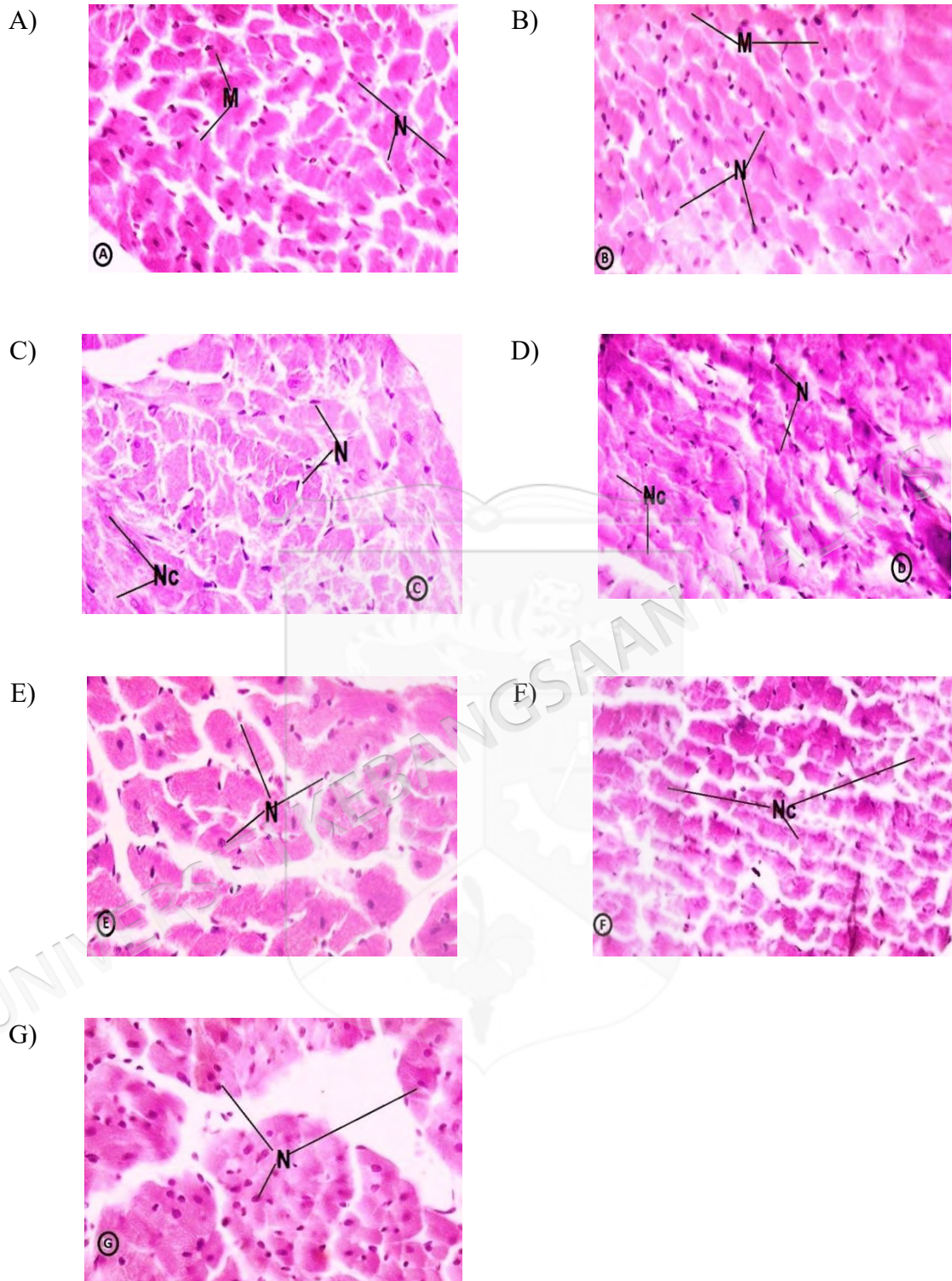
d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.9 KAJIAN HISTOLOGI

4.9.1 Pewarnaan Hematosilin Dan Eosin (H&E)

Kumpulan kontrol (SHAM) menunjukkan nukleus yang bulat dan besar pada bahagian tengah gentian otot jantung. Satu corak yang sama boleh didapati dalam kumpulan OVX(n). Kehadiran sel nekrotik dalam tisu jantung kumpulan 5HPO dan 10HPO diperhatikan. Sel nekrotik dapat dikenal pasti dengan ciri eosinofiliknya yang berwarna merah jambu terang berbanding dengan sel normal sekitarnya. Didapati nekrosis dan inflamasi adalah jauh lebih teruk bagi kumpulan 10HPO berbanding 5HPO. Tidak terdapat nekrosis pada tisu jantung dengan pemberian ADD-X. Selain itu, lebih kurang sel inflamatori pada kumpulan tisu jantung yang diberi ADD-X.



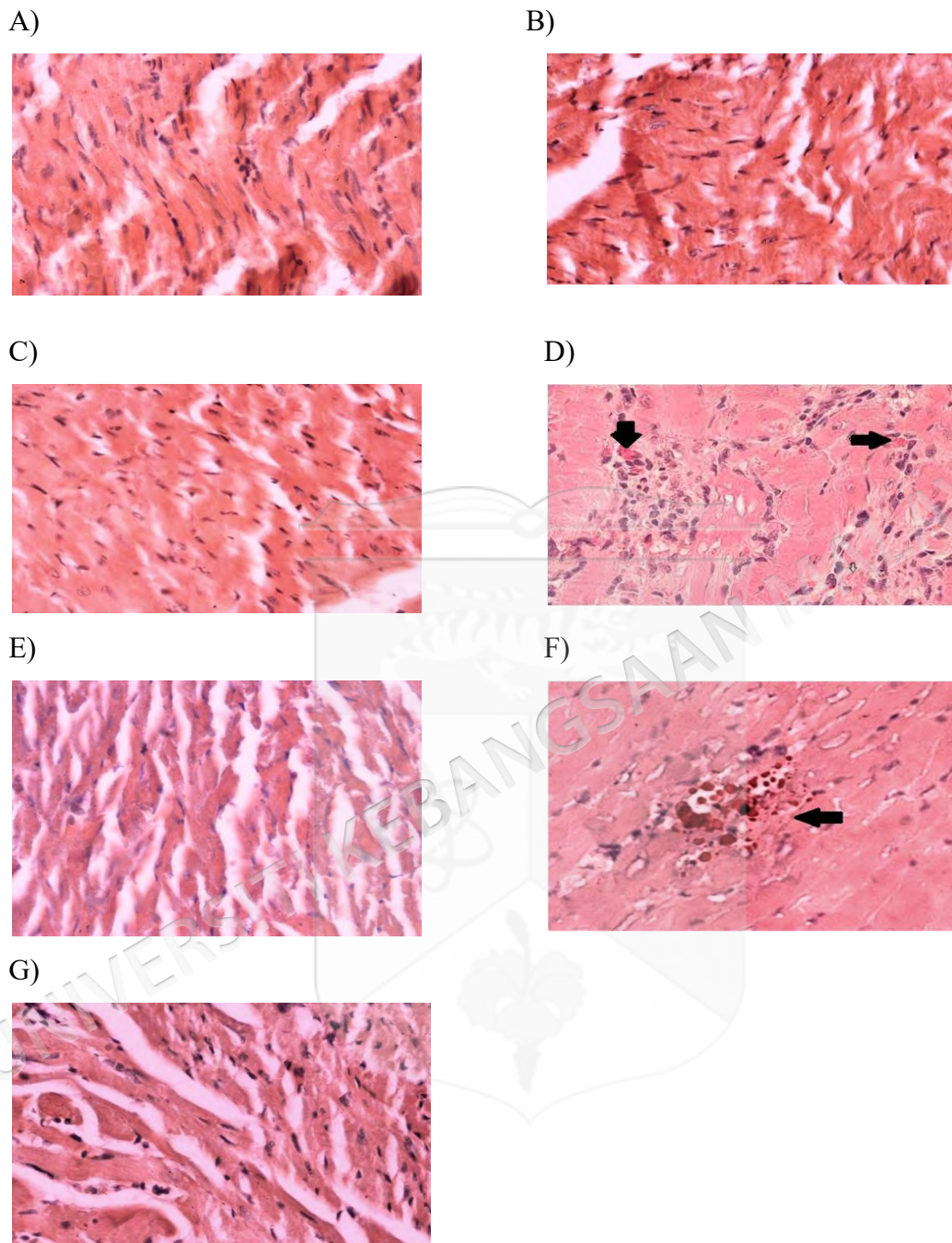


Fotomikrograf 4.9.1 menunjukkan tisu jantung dengan pewarnaan H & E (40x). N- nukleus; M- otot kardiak; Nc- sel nekrotic; A-SHAM; B-OVX(n); C- OVX(c); D- 5HPO; E-5HPO-X; F-10HPO; G-10HPO-X

4.9.2 HISTOLOGI PEWARNAAN *OIL- RED- O*

Keratan tisu jantung telah diwarnakan dengan *Oil-Red-O* untuk mengenal pasti pengumpulan lipid. Lipid akan kelihatan merah dan nukleus akan kelihatan biru. Kumpulan kontrol (sham) menunjukkan nukleus bulat dan besar berwarna biru pada bahagian tengah otot jantung. Satu corak yang sama boleh didapati dalam kumpulan yang diberi makan dengan OVX(n). Kehadiran pengumpulan lipid tinggi (berwarna merah) dalam tisu jantung kumpulan 5HPO dan 10PO dapat diperhatikan. Pengumpulan lipid adalah sederhana dalam tisu jantung kumpulan 5HPO-X dan kumpulan 10HPO-X.



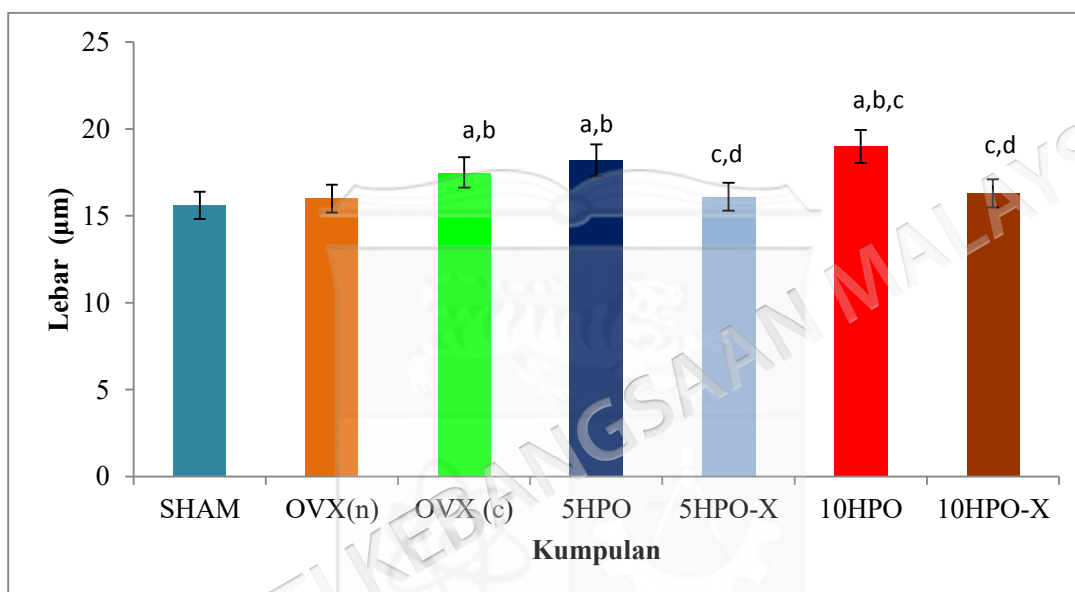


Fotomikrograf 4.9.2 menunjukkan tisu jantung dengan pewarnaan *Oil-Red-O*(40X). Sel kardiak dapat dilihat berwarna merah keorenan manakala akumulasi lipid intra-miokardial berwarna kemerahan (➡). A- SHAM; B-OVX(n); C- OVX(c); D- 5HPO; E- 5HPO-X; F-10HPO; G- 10HPO-X

4.10 HISTOMORFOMETRI TISU JANTUNG

4.10.1 Lebar Kardiomiosit

Pada akhir kajian terdapat peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) pada kelebaran kardiomiosit di keratan ventrikel kiri dalam kumpulan OVX(c), 5HPO, 10HPO berbanding dengan kumpulan yang diberi ADD-X (5HPO-X dan 10HPO-X).



Rajah 4.18: Lebar kardiomyofiber dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

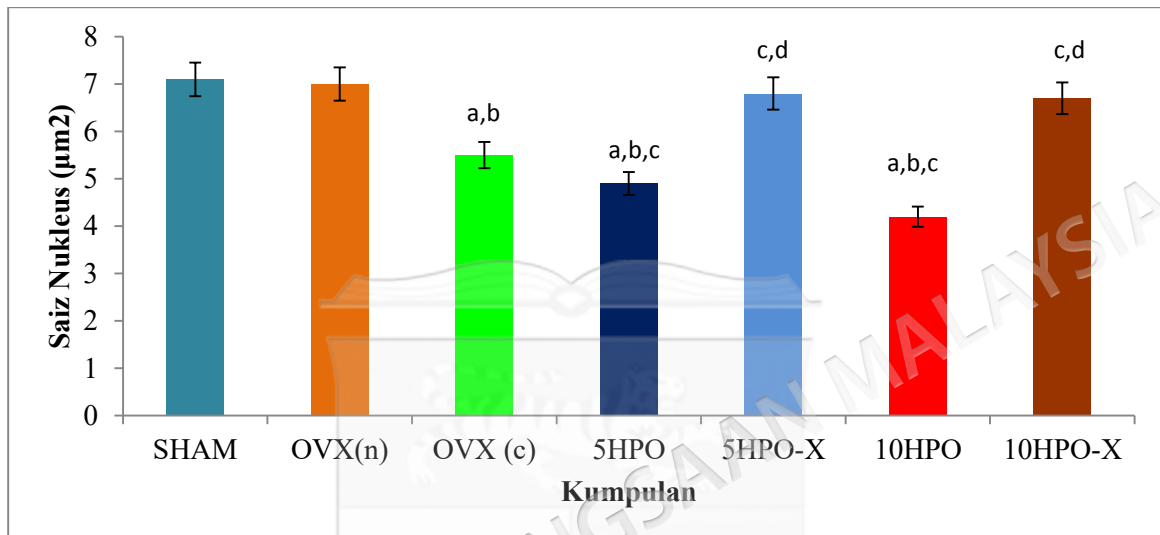
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.10.2 Saiz Nukleus Kardiomyofiber

Pada akhir kajian terdapat penurunan yang signifikan ($p < 0.05$) pada saiz nukleus kardiomyofiber pada ventrikel kiri dalam kumpulan OVX(c), 5HPO, 10HPO ($p < 0.05$), berbanding kumpulan yang diberi ADD-X (5HPO-x dan 10HPO-x).



Rajah 4.19: Saiz nukleus kardiomyofiber dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM (n=6).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

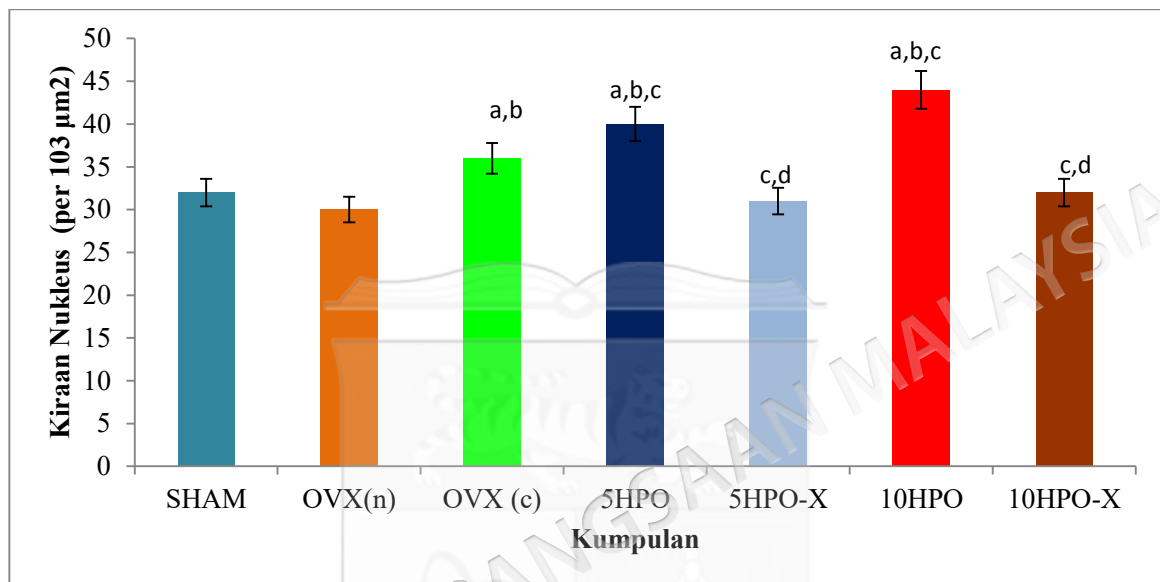
b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO /10HPO masing-masing

4.11.3 Jumlah Nukleus Kardiomyofiber

Pada akhir kajian terdapat peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$), dalam jumlah nukleus kardiomyofiber pada ventrikel kiri pada kumpulan OVX(c), 5HPO, 10HPO berbanding kumpulan yang diberi ADD-X (5HPO-x dan 10HPO-x).



Rajah 4.20: Kiraan nukleus kardiomyofiber dalam kumpulan kawalan (SHAM), ovariectomi diberi diet normal (OVX(n)), ovariectomi diberi diet kolesterol (OVX(c)), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali (5HPO), minyak kelapa sawit dipanaskan lima kali + ADD-X (5HPO-X), minyak dipanaskan sebanyak sepuluh kali (10HPO), minyak yang dipanaskan sebanyak sepuluh kali + ADD-X (10HPO+ADD-X). Data ditunjukkan dalam purata \pm SEM ($n=6$).

a = berbeza berbanding dengan kumpulan SHAM

b = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(n)

c = berbeza berbanding dengan kumpulan OVX(c)

d = berbeza berbanding dengan kumpulan 5HPO dan 10HPO

BAB V

PERBINCANGAN

5.1 NILAI PEROKSIDA

Nilai peroksida minyak kelapa sawit dan minyak kelapa sawit dengan penambahan ekstrak ADD-X dalam kajian ini telah dinilai untuk menentukan tahap pengoksidaan minyak berkenaan lalu mengenalpasti minyak yang selamat dalam pengambilan harian. Nilai peroksida dalam kajian ini telah didapati meningkat dengan peningkatan kadar bilangan pemanasan minyak kelapa sawit. Keputusan yang sama ini juga telah dilaporkan oleh pengkaji terdahulu, Jaarin dan Kamsiah (2012); Kamsiah et al (2012); Leong et al. (2012). Oleh yang demikian, adalah didapati bahawa semakin banyak kali minyak kelapa sawit dipanaskan, nilai peroksida dalam minyak tersebut semakin meningkat. Nilai peroksida kerap digunakan sebagai petunjuk bagi kestabilan oksidatif lemak dan minyak (Talpur et al. 2010; Karoui et al. 2011) ataupun tahap kemerosotan kualitinya (Karoui et al.2011). Pengukuran nilai peroksida dalam minyak sayuran mencerminkan paras oksidatif lipid. Bilangan kehadiran peroksida dalam minyak sayuran mencerminkan paras oksidatif dan kecenderungannya menjadi tengik (Marina et al. 2009) di samping kemerosotan kualiti minyak sayuran berkenaan. Dalam kajian ini, minyak kelapa sawit yang segar mempunyai nilai peroksida yang rendah berbanding minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima dan sepuluh kali (Subermaniam et al. 2014). Nilai peroksida minyak kelapa sawit yang dipanaskan sepuluh kali dalam kajian ini adalah 12 meq / kg yang melebihi had yang disyorkan oleh AOCS (2003). Minyak yang dipanaskan satu kali, dua kali, lima kali dan sepuluh kali mempunyai corak peningkatan nilai peroksida yang selari dengan peningkatan kadar pemanasan minyak sama seperti

yang dilaporkan oleh Leong et al. (2012) & Kamsiah et al. (2012). Perkara ini berlaku disebabkan oleh degradasi haba yang meningkat pada minyak berkenaam semasa proses pemanasan berulang minyak itu (Isong et al. 1996; Dia et al.2005; Adam et al. 2008) yang seterusnya membawa kepada peningkatan pengoksidaan lipid dalam minyak berkenaam (Frankel, 1980; Owu et al. 1998; Dia et al.2005).

Semua pemerhatian ini telah menunjukkan bahawa pemanasan minyak kelapa sawit berulang kali merosotkan kualiti minyak berkenaam. Walau bagaimanapun, minyak kelapa sawit yang dipanaskan sekali dan dua kali masih mempunyai nilai peroksida yang rendah (Leong et al. 2012; Kamsiah et al. 2012; Ng et al. 2012,2014) kerana masih dibawah aras piawai keselamatan minyak masak yang disyorkan oleh AOCS (2003) (Rani et al. 2010). Ini mungkin disebabkan oleh nisbah kandungan asid lemak tepu dan taktepu yang hampir sama (Edem, 2002). Minyak kelapa sawit yang mempunyai lebih kandungan asid lemak monotaktepu berbanding dengan politaktepu seperti minyak soya memberikan ia kestabilan oksidatif yang lebih kukuh terhadap pengoksidaan lipid (Zambiasi et al.2007).

Nilai peroksida bagi minyak kelapa sawit segar dengan penambahan ADD-X menunjukkan nilai yang rendah di mana ia berada di bawah paras yang disyorkan oleh AOCS (2003). Ini adalah mungkin disebabkan oleh kandungan SFA yang tinggi dalam minyak sawit segar dengan penambahan ADD-X yang mempunyai kestabilan oksidatif yang tinggi berbanding asid lemak taktepu terutamanya PUFA yang mana lebih sensitif pada pengoksidaan haba dan mudah teroksida (Choe dan Min 2007). Justeru itu, ikatan asid lemak tepu yang tidak mudah diputuskan oleh tindakbalas pengoksidaan lipid memberikan minyak ini kekuatan terhadap stress oksidatif tanpa menghasilkan produk teroksida yang menyumbang kepada patogenesis berbagai penyakit (Kunsch dan Medford 1999).

5.2 KAJIAN PERTUMBUHAN TIKUS DAN PENGAMBILAN MAKANAN

Pada akhir kajian ini, terdapat peningkatan berat badan bagi kesemua kumpulan dalam kajian ini berbanding berat badan asal. Keputusan ini didapati sama dengan kajian terdahulu oleh Leong et al.(2008, 2010) and Ng et al. (2012). Keputusan ini

mencadangkan pengambilan makanan yang dicampur dengan 15% 5HPO dan 10HPO tidak memberi kesan terhadap tumbesaran tikus berkenaan. Keputusan hasil kajian terdahulu (Oluba et al. 2008) juga telah melaporkan bahawa penambahan minyak sayuran dalam makanan tikus tidak menjejaskan selera makan dan pertumbuhannya. Kumpulan tikus 5HPO dan 10HPO menunjukkan purata pengambilan makanan yang lebih rendah berbanding kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X. Pengurangan pengambilan makanan mungkin disebabkan oleh pengaruh beberapa faktor seperti, rasa, bau tengik hasil pemanasan minyak (Debnath et al. 2012; Hamsi et al. 2015) dan tekstur terhadap pengambilan makanan berkenaan (Larsen et al. 2011). Selain daripada faktor tersebut, Burenjarga dan Totani (2008) juga mencadangkan bahawa campuran minyak sayuran yang dipanaskan berulang kali dalam makanan juga boleh mengganggu proses pencernaan dalam tikus kajian ini. Ini seterusnya menyebabkan kurang pengambilan makanan.

Dalam kajian ini didapati pemberian ekstrak ADD-X (5HPO-X dan 10HPO-X) tidak menyebabkan peningkatan berat badan yang mendadak berbanding dengan kumpulan 5HPO dan 10HPO. Sungguhpun demikian, apa yang menarik di sini adalah tikus kumpulan yang diberi ADD-X mempunyai jumlah pengambilan makanan yang paling tinggi jika dibandingkan dengan kumpulan 5HPO dan 10HPO. Berat badan tikus 5HPO-X dan 10HPO-X didapati tidak meningkat walaupun jumlah pengambilan yang meningkat berkemungkinan kerana rasa dan tekstur makanan yang lebih sedap dengan penambahan ekstrak ADD-X. Selain itu ekstrak ADD-X mempunyai kandungan antioksidan seperti polifenol yang berpotensi dalam mengurangkan penyerapan minyak pada makanan seterusnya mengelakkan pengumpulan lemak yang berlebihan untuk mengelakkan peningkatan berat badan secara mendadak (Mohamed & Nor, 2013)

5.3 KAJIAN TEKANAN DARAH

Pada akhir kajian ini telah didapati tikus dalam kumpulan 5HPO dan 10HPO mempunyai tekanan darah min, tekanan darah sistolik dan diastolik (BP) yang meningkat tinggi dengan signifikan jika dibandingkan dengan kumpulan SHAM. Keputusan ini didapati sama dengan pengkaji terdahulu (Leong et al.2008; Jaarin et al.2011; Ng et al. 2012; Nurul-Iman et al. 2013) di mana telah dilaporkan bahawa tikus yang diberi makanan yang

mengandungi minyak yang teroksida, menunjukkan peningkatan tekanan darah yang ketara jika dibandingkan dengan tikus dalam kumpulan kawalan dan minyak segar (Osim et al.1996). Kesan pengambilan 5HPO dan 10HPO ke atas tekanan darah mungkin disebabkan oleh tekanan oksidatif yang menyebabkan ketidakfungsiaan endotelium di mana ia dapat dilihat melalui perubahan pada paras nitrik oksida (Ng et al.2012; Nurul-Iman et al.2013). Minyak sawit mengandungi PUFA yang tinggi berbanding kandungan asid lemak tepu (SFA). Selain itu pemanasan minyak berulang kali menyebabkan pembentukan asid lemak tak tepu yang memberi kesan kepada kandungan kolesterol dalam badan (Mensink dan Katan 1990) lalu meningkatkan tekanan darah dalam kumpulan 5HPO dan 10HPO berbanding SHAM. Selain itu, tindakan memanaskan minyak secara berulang kali telah menyebabkan pengoksidaan dan hidrolisis justeru menyebabkan kemerosotan kualiti minyak (Dobarganes et al. 2000). Kajian terdahulu menunjukkan bahawa tekanan darah meningkat kerana penggunaan minyak sawit yang dipanaskan berulang kali (Leong et al 2009; Leong et al 2010) selaras dengan kajian Soriguer et al. (2003) yang juga mendapati minyak yang dipanaskan berulang kali mempunyai kualiti minyak yang merosot.

Tekanan darah meningkat dengan penggunaan minyak teroksida boleh dikaitkan dengan peningkatan penghasilan radikal bebas justeru meningkatkan tekanan oksidatif yang diakibatkan oleh penghasilan ROS semasa proses penggorengan. Ini bermaksud radikal bebas yang tinggi berupaya menurunkan paras antioksidan seperti SOD, CAT dan GSH dan meningkatkan paras TBARS yang seterusnya akan meningkatkan tekanan darah (Chan et al.2006; Beg et al.2010). Peningkatan darah dalam kumpulan 5HPO dan 10HPO juga boleh dikaitkan dengan ROS yang terhasil semasa pemanasan minyak. Penghasilan ROS yang terlampau banyak berupaya merosakkan sel dan menyebabkan juga peningkatan pada paras penanda inflamasi CRP dan TNF- α yang telah diperhatikan dalam kajian ini. Perkara ini juga telah dilaporkan oleh Nurul-Iman et al.2013 dalam kajiannya. Mekanisme ini melibatkan membran sel yang merupakan struktur yang sensitif terhadap serangan oksidatif oleh kerana ia sangat kaya dengan PUFA. PUFA pula adalah asid lemak yang mudah teroksida semasa pemanasan yang menjelaskan bagaimana tekanan darah meningkat. Ini mencadangkan bahawa pemanasan minyak kelapa sawit berulang kali bagi tempoh masa yang panjang dengan suhu yang tinggi,

mampu menghasilkan radikal bebas. Pada masa yang sama kehadiran antioksidan seperti vitamin E dan karotena di dalam minyak masak akhirnya akan termusnah dalam proses pemanasan tersebut lalu memberi ruang kepada mekanisme peningkatan tekanan darah seperti yang telah diterangkan.

Tekanan darah min dan tekanan darah sistolik tikus dalam kumpulan yang diberi ekstrak ADD-X (5HPO-X dan 10HPO-X) diperhatikan adalah lebih rendah daripada kumpulan SHAM pada akhir tempoh kajian selama dua puluh empat minggu. Kajian ini telah menunjukkan pengambilan ekstrak ADD-X berupaya menurunkan tekanan darah yang diakibatkan oleh pengambilan makanan bersama 5HPO. Ng et al. (2012) telah melaporkan bahawa FPO menurunkan tekanan darah dan ini dikaitkan dengan kandungan antioksidan yang tinggi dalam minyak kelapa sawit segar. Walau bagaimanapun, penambahan ADD-X dalam minyak yang dipanaskan lima dan sepuluh kali tidak menyebabkan perubahan signifikan pada tekanan darah min dan tekanan darah sistolik. Ini adalah mungkin dua puluh empat minggu rawatan tidak cukup untuk melihat perubahan yang signifikan pada tikus. Tetapi terdapat pengurangan pada tekanan darah diastolik pada akhir kajian dalam kumpulan 10HPO-X berbanding dengan 10HPO. Sementara itu, Diebolt et al. (2001) yang mengkaji pemberian kompaun polifenol untuk jangka masa pendek telah melaporkan pengurangan tekanan darah di kalangan tikus normotensif. Mereka berpendapat bahawa polifenol berupaya merangsang pembebasan nitrik oksida daripada endotelium lalu membawa kepada vasodilatasi dan penurunan tekanan darah. ADD-X yang mengandungi polifenol (Mohamed & Nor, 2013) dilaporkan mempunyai sifat antioksidan (Marina et al. 2009). Disamping itu, komponen polifenol dalam ekstrak ADD-X berkemungkinan mencegah oksidasi LDL yang boleh meningkatkan status antioksidan tikus (Mohamed dan Nor, 2013). Dalam kajian yang dilakukan oleh Nevin dan Rajamohan (2006), telah melaporkan kebolehan polifenol dalam memelihara kesihatan kardiovaskular dengan mengurangkan paras kolesterol dan parameter lipid lain. Mereka juga melaporkan bahawa semua keputusan berada dalam lingkungan normal di samping meningkatkan kepekatan HDL, di mana mereka telah mengaitkan keputusan tersebut dengan kandungan polifenol. Pemerhatian daripada kajian ini menunjukkan pengurangan paras kandungan lipid jantung seperti FFA dan TG dengan pemberian ekstrak ADD-X, justeru itu didapati peningkatan min tekanan darah,

tekanan sistolik dan diastolik dalam kumpulan tikus 5HPO-X dan 10HPO-X diperhatikan adalah lebih rendah berbanding kumpulan SHAM dengan ketara.

5.4 KAJIAN BLOKIMIA

5.4.1 Penanda Tekanan Oksidatif dan Parameter Antioksidan

Dalam kajian ini, pemanasan 5HPO dan 10HPO mengurangkan CAT, SOD dan GSH, yang disebabkan oleh tekanan oksidatif seperti dilihat dalam kajian ini. Radikal bebas adalah faktor yang mengurangkan paras antioksidan (Halliwell et al. 1995; Ahmed et al. 2000). Paras TBARS juga telah meningkat dalam kumpulan 5HPO dan 10HPO. Keputusan ini selari dengan nilai peroksida yang juga tinggi dalam sampel minyak 5HPO dan 10HPO jika dibandingkan dengan kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X. Ovariektomi menyebabkan paras estrogen berkurangan dan tidak normal. Fungsi estrogen adalah bertujuan untuk melindungi diri wanita daripada tekanan oksidatif (Abbas & Elsamanoudy, 2011). Minyak yang dipanaskan akan menyebabkan peningkatan peroksidaan lipid, maka jika minyak ini sering diambil oleh tikus menopause yang mengalami kekurangan estrogen, ia akan mengakibatkan paras antioksidan berkurang. Penemuan ini menyerupai hasil kajian Sánchez-Rodríguez et al. (2012) yang telah melaporkan bahawa tikus menopause mungkin menjadi salah satu faktor utama untuk meningkatkan tekanan oksidatif. Selain itu, kajian Vishali et al. (2005) dan Ogunro et al. (2014), juga melaporkan bahawa kekurangan estrogen akan mengurangkan paras antioksidan.

Dalam kajian ini juga, telah mendapati bahawa paras SOD, CAT dan GSH dalam kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X meningkat dengan ketara berbanding kumpulan 5HPO dan 10HPO. Pemerhatian ini sama dengan Wohaieb dan Godin, (1987); Yoshikawa et al. (1993); Vincent et al. (2001) dan Manonmani et al. (2002) yang melaporkan bahawa peningkatan paras GSH dalam tikus yang obes memberi tindak balas kepada pembebasan sisa radikal lalu melindungi sel daripada kerosakan oksidatif. Ekstrak ADD-X yang kaya dengan kandungan polifenolnya membantu mengatasi tekanan oksidatif daripada pengoksidaan lipid dalam minyak yang dipanaskan berulang kali. Kesan perlindungan

antioksidan seperti vitamin E pada penyakit kardiovaskular telahpun dikaji dan dilaporkan oleh pengkaji terdahulu (Nafeeza et al., 2000). Selain itu, polifenol juga dilaporkan keberkesannya untuk mengurangkan tekanan darah yang disebabkan oleh tekanan oksidatif (Arunabh et al. 1991; Li et al. 2015; Diebolt et al. 2001). Di dalam kajian ini didapati peningkatan yang ketara pada paras antioksidan seperti CAT, SOD dan GSH dalam kumpulan yang diberi ADD-X berbanding dengan kumpulan minyak sawit yang dipanaskan berulang kali.

5.4.2 Penanda Inflamasi

CRP dan TNF- α adalah penanda inflamasi yang digunakan untuk menentukan tahap sel inflamatori dalam tisu. Penanda inflamasi kerap digunakan oleh pengkaji sebagai parameter dalam CVD seperti tekanan darah tinggi, aterosklerosis, strok, serangan jantung dan penyakit vaskular periferi (Ridker 2003; Sesso et al. 2003; Pai et al. 2004). Peningkatan sel inflamatori akan meningkatkan tahap CRP dan TNF- α . Amalan menggunakan minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali telah menjadi kebiasaan masyarakat Malaysia untuk mengurangkan kos memasak. Tetapi ramai yang tidak mengetahui implikasi penggunaan minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali. Pengoksidaan minyak yang dipanaskan berulang kali menghasilkan ROS dengan kuantiti yang banyak. Hal ini menyebabkan kecederaan pada sel (Adam et al. 2009) yang menyebabkan inflamasi pada sel dan tisu organ. Spesis oksigen reaktif merupakan faktor utama kepada ketidakfungsian sel endotelium dan inflamasi pada tisu jantung (Harrison et al. 2007).

Dalam kajian Amran et al. (2011), telah dilaporkan bahawa paras CRP dan TNF- α meningkat dalam mekanisme patogenesis aterosklerosis apabila terdedah kepada inflamasi. Dalam kajian ini, telah didapati bahawa paras CRP dan TNF- α meningkat dalam kumpulan tikus 5HPO dan 10HPO manakala berkurang dalam kumpulan tikus yang ditambah ADD-X (5HPO-X dan 10HPO-X).

Keputusan kajian ini boleh diselarikan dengan peningkatan tekanan darah yang diperhatikan dalam kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO yang juga menunjukkan peningkatan pada paras CRP dan TNF- α berbanding dengan kumpulan 5HPO-X dan

10HPO-X secara ketara. Penemuan ini juga adalah selari dengan kajian pengkaji terdahulu, di mana mereka melaporkan bahawa aterosklerosis menyebabkan peningkatan CRP yang berhubungkait dengan peningkatan tekanan darah tinggi (Amran et al. 2011; Sesso et al. 2003). Menurut laporan Pai et al. (2004) CRP adalah penanda inflamasi yang baik dimana peningkatan paras CRP kerap digunakan untuk dignostik penyakit kardiovaskular. Selain itu, terdapat juga banyak kajian epidimeologi yang menyokong kajian mereka di mana peningkatan CRP dan TNF- α berkaitan dengan penyakit kardiovaskular (Johann Auer et al. 2002; Yayan et al. 2013).

Walau bagaimanapun, serum CRP dan TNF- α kumpulan tikus 5HPO-X dan 10HPO-X didapati lebih kurang daripada kumpulan tikus 5HPO dan 10HPO. Penambahan ekstrak ADD-X dalam minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima dan sepuluh kali mengurangkan paras inflamasi yang merupakan faktor kepada penyakit kardiovaskular. Ini adalah kerana ADD-X mempunyai kandungan antioksidan yang mengandungi polifenol. Keputusan ini selari dengan paras parameter antioksidan kajian ini yang telah menunjukkan paras yang lebih tinggi dalam kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X. Terdapat banyak kajian yang melaporkan bahawa antioksidan seperti polifenol berfungsi sebagai perlindungan terhadap penyakit kardiovaskular (Diebolt et al. 2001; Li et al. 2015).

5.4.3 Penanda Biokimia Jantung

Troponin dan LDH merupakan penanda biokimia jantung yang digunakan oleh pengkaji untuk menentukan aktiviti tisu jantung. Peningkatan paras troponin dan LDH menandakan gangguan dalam fungsi jantung yang normal (Risenfors et al. 1991). Dalam kajian ini, telah diperhatikan bahawa paras troponin dan LDH telah meningkat dalam tikus kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO. Ini dapat difahami bahawa pemanasan minyak kelapa sawit berulang kali boleh menyebabkan kecederaan, inflamasi dan nekrosis pada tisu jantung, justeru menyebabkan gangguan pada aktiviti jantung seperti biasa. Keputusan ini adalah selari dengan Hamsi et al. (2014) yang turut melaporkan bahawa peningkatan aktiviti troponin dan LDH diperhatikan dalam penyakit kardiovaskular. Selain itu, menurut laporan Leong et al. (2009) disfungsi tisu jantung

berlaku kerana kecederaan tisu jantung yang mungkin disebabkan oleh tindak balas inflamasi pada sel endotelial dalam tisu jantung yang disebabkan oleh pembentukan radikal bebas dan ROS. ROS terhasil akibat daripada pengoksidaan lipid yang disebabkan oleh minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali. Paras LDH dan troponin akan meningkat apabila berlaku kecederaan pada sel dan tisu, terutamanya dalam penyakit kardiovaskular telah (Drent et al. 1996). Kerosakan tisu boleh dikaitkan dengan keradangan ROS yang telah dijana oleh pengoksidaan haba minyak yang berulang kali dipanaskan dan menyebabkan kecederaan sel endotelial (Drent et al. 1996).

Dalam kajian ini didapati bahawa, paras troponin dan LDH dalam tikus kumpulan SHAM, OVX(n), 5HPO-X dan 10HPO-X adalah lebih rendah berbanding dengan tikus kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO. Walaupun kandungan Vitamin E yang tinggi dalam minyak kelapa sawit segar mempunyai kandungan antioksidan yang tinggi tetapi ia akan berkurang apabila dipanaskan. Pemanasan berulang kali akan menyebabkan antioksidan tidak mencukupi untuk melindungi pengguna daripada tekanan oksidatif (Diebolt et al. 2001; Li et al. 2015). Ekstrak ADD-X yang ditambah dalam minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima dan sepuluh kali mengurangkan paras inflamasi yang merupakan faktor kepada penyakit kardiovaskular. Ini adalah kerana ADD-X mempunyai kandungan antioksidan yang mengandungi polifenol. Keputusan ini adalah selari dengan paras parameter antioksidan yang telah menunjukkan paras yang lebih tinggi dalam kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X.

5.4.4 Kandungan Lipid dan Berat Jantung

FFA dan TG adalah paras yang diukur untuk menentukan kandungan lipid jantung. Hasil kajian ini juga menunjukkan peningkatan paras FFA dan TG jantung dalam tikus kumpulan 5HPO dan 10HPO berbanding tikus kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X. Keputusan ini boleh dikaitkan dengan berat badan tikus kumpulan 5HPO dan 10HPO yang juga telah meningkat. Pengambilan diet kolesterol tinggi dengan minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali pada suhu yang tinggi dianggap bahawa ia boleh memendapkan lemak pada jantung yang menyumbang kepada peningkatan kandungan lipid jantung. Hasil kajian ini adalah selari dengan Osim et al. (1994) dan Adam et al.

(2007, 2008) yang turut melaporkan bahawa tikus yang diberi makanan bersama minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali menunjukkan peningkatan pada kandungan lipid jantung. Pengambilan minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali mempercepatkan peningkatan FFA dan TG. Pendepositan FFA dan TG pada tisu jantung adalah merupakan salah satu faktor risiko kepada penyakit kardiovaskular (Ebbert & Jensen, 2013) lalu menyebabkan dislipidemia dan obesiti (Jensen et al. 2008). Hal ini, dipercepatkan lagi dalam tikus terovariektomi yang menyerupai modal menopause.

Walau bagaimanapun, kumpulan yang diberi penambahan ekstrak ADD-X dalam minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali (5HPO-X dan 10HPO-X) menunjukkan kandungan lipid jantung yang jauh lebih rendah daripada tikus kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10HPO. Yang menarik perhatian adalah walaupun tikus kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X telah menunjukkan pengambilan makanan yang lebih tinggi berbanding tikus kumpulan 5HPO dan 10HPO tetapi berat badan, kandungan lipid jantung dan berat tisu jantung tikus kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X adalah lebih rendah berbanding kumpulan 5HPO dan 10 HPO secara ketara. Hal ini boleh dijelaskan, bahawa ekstrak ADD-X mempunyai kandungan antioksidan seperti polifenol yang berpotensi mengurangkan penyerapan minyak pada makanan justeru mengelakkan pengumpulan lemak yang berlebihan yang menyebabkan peningkatan berat badan yang mendadak (Mohamed & Nor, 2013).

5.5 KAJIAN HISTOLOGI

5.5.1 Histologi Tisu Jantung dengan Pewarnaan H&E

Pewarnaan hematoxylin dan eosin dilakukan pada tisu jantung untuk memerhatikan kardiomyosit pada semua kumpulan tisu jantung. Menurut Shastry et al. (2011) dalam kajiannya tikus yang diberi minyak yang dipanaskan berulang kali menunjukkan vakuolasi yang besar dan berlemak diperhatikan di dalam serat kardiomyofiber (*heart muscle fiber*). Selari dengan itu, Leong et al. (2008) juga mendapati tikus yang diberi minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali juga menunjukkan terdapat sel nekrosis dalam tisu jantung. Selain itu, vakuolasi dalam otot

papillari juga telah didokumenkan (Frag Radwan et al. 2010). Dalam kajian ini, tikus kumpulan 5HPO dan 10HPO menunjukkan lebih banyak vakul dalam kardiomiosit berbanding tikus kumpulan SHAM, 5HPO-X dan 10HPO-X. Keputusan ini selari dengan paras penanda inflamasi CRP dan TNF- α yang menunjukkan tikus kumpulan 5HPO dan 10HPO menghasilkan paras CRP dan TNF- α yang lebih tinggi berbanding dengan tikus kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X. Hasil kajian TBARS dalam serum dan nilai peroksida minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali dalam kumpulan 5HPO, 10HPO meningkat tetapi, kumpulan yang diberi ADD-X menunjukkan paras yang lebih rendah (Sukalingam et al. 2016). Pengkaji terdahulu, mendapati bahawa inflamasi menyebabkan lebih banyak sel inflamatori yang terhasil pada tisu jantung lalu menyebabkan lebih banyak vakul kelihatan (Frag Radwan et al. 2010). Minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali menyebabkan pengoksidaan lipid yang disebabkan oleh radikal bebas justeru menyebabkan sel endotelium tisu jantung cedera dan menyebabkan inflamasi dan peningkatan vakulasi (Edem et al. 2002). Peningkatan bilangan sel inflamatori selepas penggunaan minyak sawit yang dipanaskan berulang kali apabila diperhatikan oleh Ng et al (2012) (2014). Dalam kajian Pai et al (2004) serta Ghanem dan Movahed (2007) telah dilaporkan bahawa inflamasi juga mendorong peningkatan tekanan darah serta penyakit kardiovaskular. Manakala, kumpulan tikus yang diberi ADD-X (5HPO-X dan 10HPO-X), mempunyai tahap antioksidan yang tinggi, terutamanya polifenol. Polifenol (Li et al. 2015) mempunyai kesan melindungi tisu jantung daripada kecederaan dan inflamasi. Ini menjelaskan pemerhatian pada tisu jantung tikus kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X yang menunjukkan kurang vakul berbanding tikus kumpulan 5HPO dan 10HPO.

5.5.2 Histologi Tisu Jantung dengan *Oil-Red-O*

Pewarnaan *Oil-Red-O* pada tisu jantung bagi kumpulan 5HPO dan 10HPO didapati mempunyai kehadiran akumulasi lipid yang tinggi yang diperhati berwarna merah tetapi akumulasi lipid adalah sederhana dalam tisu jantung diberi dengan kumpulan 5HPO-x dan kumpulan 10HPO-X. Akumulasi lipid dalam tisu jantung adalah berdasarkan kepada berat badan dan berat jantung. Ianya mungkin disebabkan oleh kewujudan asid

lemak yang tinggi kerana mekanisme pengoksidaan asid lemak, dimana lemak asil-COA akan berakumulasi dalam sel. Asid lemak yang berlebihan seperti asil-COA menjadi pengesteran untuk membentuk titisan lipid dalam sitoplasma, di mana yang selebihnya akan mengganggu mekanisme isyarat selular normal, justeru itu menyebabkan akumulasi lipid pada tisu jantung (Unger dan Orci, 2001; Schmitz-Peiffer, 2000). Sel mengatasi masalah ini dengan meningkatkan kapasiti pengoksidaan asid lemak dalam menghadapi peningkatan asid lemak dalam tisu jantung. Mekanisme di mana asid lemak yang ada, adalah berlebihan boleh menyebabkan *contractile dysfunction*. (Young et al. 2002; Thompson dan Cooney, 2000; Connelly et al. 1994). Seperti yang dijelaskan sebelum ini sifat antioksidan ADD-X membantu dalam mengurangkan pengoksidaan lipid.

5.6 HISTOMORFOMETRI TISU JANTUNG

Kajian histomorfometri ke atas tisu jantung telah digunakan dalam pengkajian ini bagi mengenalpasti kesan minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali serta menentukan kemampuan penambahan ekstrak ADD-X dalam minyak sawit yang dipanaskan berulang kali untuk menghalang kemudahan terhadap tisu jantung. Hasil kajian ini mendapati bahawa saiz kardiomyofiber tikus yang diberi OVX(c), 5HPO dan 10HPO meningkat dengan signifikan berbanding dengan kumpulan SHAM, 5HPO-X dan 10HPO-X. Keputusan ini mencadangkan bahawa pengambilan 5HPO dan 10HPO yang menyebabkan peningkatan dalam tekanan darah seterusnya meningkatkan saiz kardiomyofiber sebagai reaksi pembentukan semula kompensatori dan hipertrofi tisu jantung. Malah pendapat ini adalah selari dengan hasil kajian terdahulu yang dilakukan pada sampel manusia di mana telah dilaporkan bahawa diameter kardiomyofiber dengan jantung dewasa yang normal (Hoshino et al. 1983)

Peningkatan lebar kardiomyofiber mencadangkan hipertrofi tisu jantung yang telah dapat dilihat dengan jelas dalam kumpulan tikus yang diberi OVX(c), 5HPO dan 10HPO. Leong et al (2009) telah melaporkan gangguan pada vasorelaksasi dan peningkatan vasokonstriksi pada tikus akibat pengambilan diet minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali telah meningkatkan tekanan darah, yang mana kemudiannya boleh menyebabkan kecederaan tisu jantung. Peningkatan tekanan darah yang

berpanjangan akan menyebabkan hipertrofi jantung. Perubahan awal pada struktur jantung sebagai mekanisme kompensatori terhadap beban tekanan tinggi dan tekanan, mungkin boleh mencetuskan hipertrofi maladaptif pada kardiomyosit yang ditunjukkan dengan peningkatan saiznya (Leonard et al. 2012)

Terdapat juga kajian lain yang melaporkan bahawa hipertrofi kardiomyofiber adalah disebabkan oleh peningkatan stres pada dinding jantung akibat daripada hipertensi sistemik (Tanaka et al. 1986). Dalam kajian ini pula, didapati bahawa penambahan ekstrak ADD-X telah berupaya merencat kejadian hipertrofi. Ini dapat diperhatikan melalui nilai lebar kardiomyofiber tikus kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X yang rendah.

Adaptasi jantung sebagai respon kepada stres intrinsik atau ekstrinsik melibatkan satu proses kompleks dalam pembentukan semula ruang jantung dan modifikasi saiz kardiomyofiber. Hipertrofi kardiomyofiber dan ruang jantung adalah tindakbalas asas terhadap peningkatan stres biomekanikal (Sonnenblick & Anversa, 1999; Mandarim-de-Lacerda & Meirelles Pereira, 2000). Stres oksidatif dilaporkan sebagai mekanisme yang penting dalam kejadian ini (Giordano, 2005).

Seperti yang telah diterangkan dalam awal bab ini, pengambilan 5HPO dan 10HPO meningkatkan penghasilan ROS dalam sirkulasi yang membawa kepada ketidakfungsian atau kematian sel dan pengoksidaan lipid. Ini seterusnya mengakibatkan kemusnahan atau kematian sel yang muktamad. ROS juga dipercayai terlibat dalam mekanisme perangsang pembentukan semula tisu miokardium (hipertrofi) melalui pengaktifan *hypertrophy signalling kinase* yang terdiri daripada pelbagai jenis dan faktor transkripsi (Sabri et al. 2013). Passier et al. (2000) telah melaporkan bahawa salah satu *hypertrophy signalling kinase* seperti laluan transduksi isyarat yang bergantung kepada Ca^{2+} atau kalmodulin telah dikaitkan dalam hipertrofi jantung tetapi ianya tidak jelas sama ada laluan tersebut adalah pencetus kepada hipertrofi ataupun ianya saling bergantung antara satu sama lain. Oleh yang demikian, ada kemungkinan bahawa hipertrofi sel jantung yang dipamerkan dengan peningkatan kelebaran kardiomyofiber dalam kajian ini mungkin disebabkan oleh ROS yang terhasil akibat pengoksidaan lipid yang berlaku dalam minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima dan sepuluh kali.

Pengoksidaan lipid dalam 5HPO dan 10HPO pula telah pun dibuktikan dengan nilai peroksida tinggi dan juga paras TBARS, CRP, TNF- α , LDH, troponin, FFA dan TG

yang tinggi pada tikus yang diberi 5HPO dan 10HPO dalam kajian ini. Apabila dilihat pada kajian histologi didapati juga kerosakan berlaku kepada tisu jantung. Saiz kelebaran kardiomyofiber yang besar dalam jantung tikus kumpulan 5HPO dan 10HPO. Ini menggambarkan bahawa minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali menyebabkan kecederaan pada tisu jantung yang menyebabkan penyakit kardiovaskular. Pada masa yang sama, nilai lebar kardiomyofiber tikus kajian yang diberi 5HPO dan 10HPO bersama ADD-X (5HPO-X dan 10HPO-X) adalah lebih rendah daripada kumpulan 5HPO dan 10HPO dan juga hampir sama dengan kumpulan SHAM. Walaupun dengan penambahan ekstrak ADD-X saiz kelebaran kardiomyofiber bagi kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X didapati kecil berbanding kumpulan 5HPO dan 10HPO, malah menghampiri nilai saiz kelebaran miofiber kumpulan SHAM. Ini mencadangkan bahawa penambahan ekstrak ADD-X dalam minyak mempunyai stabiliti yang tinggi terhadap pengoksidaan lipid di samping kandungan antioksidan yang tinggi, mampu menghalang tindakan ROS yang merangsang mekanisme hipertrofi kardiomyofiber. Saiz nukleus dan bilangan nukleus kardiomyofiber tikus yang diberi OVX(c), 5HPO dan 10HPO juga didapati mengecil dengan signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan dan kumpulan yang diberi 5HPO-X dan 10HPO-X. Leong et al (2008) dalam kajiannya melaporkan bahawa tisu jantung tikus yang mengambil 5HPO diperhatikan mempunyai nekrosis. Mereka mencadangkan bahawa ini mungkin disebabkan oleh degenerasi struktur protein dalam sitoplasma yang membawa kepada pembentukan jisim yang homogenus. Dalam kajian ini, didapati bahawa tikus kumpulan OVX(c), 5HPO dan 10 HPO menunjukkan saiz nukleus yang lebih kecil daripada kumpulan SHAM, OVX(n), 5HPO-X dan 10HPO-X. Hasil ini mencadangkan kondensasi nuklei yang biasanya berlaku akibat koagulasi kromatin dalam nuklei dan ini mungkin merupakan tanda awal piknosis tanpa proliferasi sel (Nevin & Rajamohan, 2006).

Dengan ini, boleh disimpulkan bahawa diet 5HPO dan 10HPO telah mencetuskan kardiomyopati yang mana mungkin telah membawa kepada ketidakfungsian kardiovaskular. Pada masa yang sama ekstrak ADD-X dalam minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang kali pula telah memberi gambaran bahawa ianya mampu mencegah perubahan histopatologi pada miosit. Kesan perlindungan jantung oleh ekstrak ADD-X mungkin telah berlaku pada peringkat awal di mana ia telah mencegah kejadian tekanan

darah tinggi, paras TBARS (Sukalingam et al. 2016), CRP, TNF- α , troponin, LDH, FFA dan TG, dan ia mungkin disebabkan oleh kandungan antioksidannya yang tinggi yang selari dengan peningkatan paras parameter antioksidan seperti SOD, CAT dan GSH dalam kajian ini.



BAB VI

KESIMPULAN DAN CADANGAN PENAMBAHBAIKAN

6.1 KESIMPULAN

Berdasarkan kepada kajian ini, dapat disimpulkan bahawa nilai peroksida minyak kelapa sawit yang dipanaskan lima kali (5HPO) dan sepuluh kali (10HPO) adalah lebih tinggi daripada nilai peroksida yang diperolehi daripada minyak kelapa sawit segar (FPO) dan minyak kelapa sawit yang panaskan lima kali (5HPO-X) dan sepuluh kali (10HPO-X) dengan tambahan ekstrak ADD-X. Diet yang terdiri daripada 15% 5HPO dan 10HPO telah meningkatkan aras penanda inflamasi (CRP dan TNF- α), aras penanda biokimia jantung (LDH dan troponin), aras kandungan lipid jantung (FFA dan TG) dan berat jantung pada tikus kajian juga didapati lebih tinggi pada tikus yang diberi diet 15%. Sementara itu, penambahan ekstrak ADD-X kepada diet di atas telah menurunkan aras penanda inflamasi (CRP dan TNF- α), aras penanda biokimia jantung (LDH dan troponin), aras kandungan lipid jantung (FFA dan TG) dan berat jantung tikus kajian 5HPO-X dan 10HPO-X. Penggunaan minyak sawit yang dipanaskan lima (5HPO) dan sepuluh kali (10HPO) mengurangkan aras antioksidan (CAT, SOD, dan GSH) tetapi meningkatkan tekanan oksidatif (TBARS) dalam serum darah. Walau bagaimanapun, kumpulan yang diberi tambahan ekstrak ADD-X memulihkan tahap antioksidan dan menurunkan aras TBARS dalam serum darah tersebut. Apabila tisu jantung diperiksa dibawah mikroskop cahaya didapati bahawa tisu jantung tikus yang diberi makanan yang mengandungi 15% 5HPO dan 10HPO mempunyai vakuol inflamasi dan akumulasi lipid yang lebih, serta pemodelan semula seperti hipertrofi pada kardiomyofiber di samping pengecutan saiz

nukleusnya. Walau bagaimanapun, dengan penambahan ekstrak ADD-X tisu jantung kumpulan 5HPO-X dan 10HPO-X tidak mempunyai perubahan yang sama.

6.2 LIMITASI KAJIAN

1. Kesan jangka panjang 5HPO dan 10HPO serta keberkesanan ADD-X ke atasnya tidak dapat dikaji disebabkan tempoh kajian yang terhad dan keperluan menyelesaikan kajian ini dalam masa yang pendek.
2. Ubi keledak sahaja digunakan sebagai bahan gorengan bagi tujuan pemanasan minyak berulang kali tanpa mempelbagaikan bahan gorengan seperti ayam atau ikan yang boleh memberi kesan kepada nilai peroksida minyak tersebut. Nilai peroksida minyak akan meningkat jika digoreng dengan sumber haiwan kerana sumber haiwan mempunyai lemak tak tepu yang tinggi lalu meningkatkan degradasi oksidatif dalam minyak yang digoreng itu. Selain itu, masyarakat Malaysia menggunakan pelbagai jenis bahan gorengan dan bukan hanya ubi keledak.
3. Kajian biokimia seperti nitrik oksida, profil lipid serum, tromboksin tikus tidak dilakukan.
4. Kajian mikroskop elektron untuk melihat struktur tisu jantung dengan lebih teliti yang boleh mengukur dan membuktikan perubahan yang berlaku pada parameter fisiologi dan biokimia tidak dapat dijalankan disebabkan wang peruntukan yang tidak mencukupi bagi menampung kosnya.

6.3 CADANGAN PENAMBAHBAIKAN KAJIAN DI MASA HADAPAN

1. Tempoh kajian perlu dipanjangkan (lebih daripada dua puluh empat minggu) bagi mengetahui kesan jangka panjangnya ke atas sistem tubuh.
2. Ayam atau ikan perlu digunakan sebagai bahan gorengan dalam proses pemanasan minyak kelapa sawit berulang kali. Ini adalah kerana, penggunaan minyak masak berulang kali di kalangan orang awam biasanya melibatkan bahan seperti ikan, ayam atau daging dan bukannya ubi keledak semata-mata. Cadangan ini mungkin

dapat mengelakkan pengaruh kesan bahan kimia yang berbeza dalam minyak daripada bahan yang digoreng terhadap hasil kajian.

3. Kajian biokimia menggunakan serum atau plasma seperti paras nitrik oksida, profil lipid dan tromboksin perlu ditambah bagi mengkaji keberkesanan ADD-X sebagai agen antioksidan dan kebolehannya mengurangkan profil lipid darah.
4. Kajian mikroskop elektron perlu ditambah bagi mengkaji perubahan negatif dan positif pada struktur sel dan tisu sebagai kesan pengambilan 5HPO dan 10HPO serta ADD-X. Hasil kajian ini mungkin boleh membantu pengkaji mengenalpasti mekanisme yang terlibat dalam kemajuan penyakit kardiovaskular dan bagaimana ADD-X boleh mencegah keadaan tersebut.



RUJUKAN

- Abbas, A.M. & Elsamanoudy, A.Z. 2011. Effects of 17 β -estradiol and antioxidant administration on oxidative stress and insulin resistance in ovariectomized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 89(7): 497-504.
- Adam, S.K., Das, S. & Jaarin K.A. 2009. A detailed microscopic study of the changes in the aorta of experimental model of postmenopausal rats with repeatedly heated palm oil. *Int. J. Exp. Pathol.* 90: 321-327.
- Adam, S.K., Das, S., Soelaiman, I.N., Umar, N.A. & Jaarin, K.2008. Consumption of Repeatedly Heated soy Oil increases the Serum parameters related atherosclerosis in ovariectomized rats. *Tohoku J. Exp.Med.* 215: 219-226.
- Adam, S.K., Sulaiman, N.A., MdTop, M.G.& Jaarin, K. 2007. Heating reduces vitamin E content in palm and soy oils. *Malay. J. Biochem. Mol. Biol.* 15(2): 76–79.
- Adin, D. B., Oyama, M. A., Sleeper, M. M. & Milner, R. J. 2006. Comparison of canine cardiac troponin I concentrations as determined by 3 analyzers. *J. Vet. Intern. Med.* 20(5):1136-42.
- Aebi, H. 1974. In: *Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis Academic, New York.* pp 673-677.
- Ahmed, S., Rabman, A., Alam, A., Saleem, M., Athar, M. & Sultana, S. 2000. Evaluation of the efficacy of Lawsonia alba in the alleviation of the CCl₄ induced oxidative stress. *J. Ethnopharmacol.* 69:157–164.
- Amran, A. A., Zakaria, Z., Othman, F., Das, S., Al-Mekhlafi, H. M. & Nordin, N. A. M. 2011. Changes in the vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 and C-reactive protein following administration of aqueous extract of Piper Sarmentosum on experimental rabbits fed with cholesterol diet. *Lipids Health Dis.* 10: 2. doi: 10.1186/1476-511X-10-2.
- Antman, E., Bassand, J. P., Klein, W., Ohman, M., Sendon, J. L. L., Ryde'n, L., Simoons, M.& Tendera, M. 2000. Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction: The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36: 959–969.
- AOCS, 2003. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.* 4th ed. AOCS Press, Champaign , Illinois.

- Arunabh, B., Abhijit, C., Ghosal, S. & Battacharya, S.K. 1999. Antioxidant activity of active tannoid principles of *Emblica officinalis* (amla). *Indian J. Exp. Biol.* 37:676–680.
- Audley, B.W. 2006. Polar components of palm oil fruit and other tissues. PORIM Annual Research Report. *CTB3*: 374-376.
- Awney, H.A. 2011. The effects of Bifidobacteria on the lipid profile and oxidative stress biomarkers of male rats fed thermally oxidized soybean oil. *Biomarkers* 16(5): 445-452.
- Azlina, A.A., Farihah, H.S., H.M.S. & Qodriyah, 2009. Effects of Piper sarmentosum water extract on 11- β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 bioactivity in ovariectomy-induced obese rats. *Inter J. Pharmacol.* 5(6): 362–369.
- Azman, A., MohdShahrul, S., Chan, S.X., Noorhaliza, A.P., Khairunnisak, M. & Azlina, N. 2012. Level of knowledge, attitude and practice of night market food outlet operators in Kuala Lumpur regarding the usage of repeatedly heated cooking oil. *Med. J. Malay.* 67 (5): 91-101.
- Beltrami, C.A., Finato, N., Rocco, M., Feruglio, G.A., Puricelli, C., Cigola, E., Quaini, F., Sonnenblick, E.H., Olivetti, G. & Anversa, P. 1994. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation* 89:151–163.
- Biasucci, L., Colizzi, C., Rizzello, V., Vitrella, G., Crea, F. & Liuzzo, G. 2000. Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery diseases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 59:12-22.
- Bilet, L., van de Weijer, T., Hesselink, M.K.C., Glatz, J.F.C., Lamb, H.J., Wildberger, J., Kooi, M.E., Schrauwen, P. & Schrauwen-Hinderling, V.B. 2011. Exercise-induced modulation of cardiac lipid content in healthy lean young men. *Basic Res. Cardiol.* 106:307–315.
- Boskou, D. 2008. Frying temperatures and minor constituents of oils and fats. *GRASAS YACEITES* 49 (3-4): 326-330.
- Britton, G. 2005. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB* 9 (15): 1551-1558.
- Budin, S.B., Othman, F., Louis, S.R., Bakar, M.A., Das, S. & Mohamed, J. 2009. The effects of palm oil tocotrienol-rich fraction supplementation on biochemical parameters, oxidative stress and the vascular wall of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinics* 64:235-244.

- Campbell, K.A., Lipinski, M.J., Doran, A.C., Skaflen, M.D., Fuster, V., McNamara, C.A. 2012. Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis. *Circ Res* 110:889–900.
- Chahoud, G., Aude, Y.W. & Mehta, J.L. 2004. Dietary recommendations in the prevention and treatment of coronary heart disease: do we have the ideal diet yet? *Am. J. Cardiol.* 94:1260-1267.
- Chandrasoma, P. & Taylor, C.R. 2001. Concise Pathology: Cell Degeneration and Necrosis. Singapore: McGraw-Hill.
- Chobanian, A.V., Bakris, G.L., Black, H.R., Cushman, W.C., Green, L.A., Izzo, J.L., Jr, Jones, D.W., Materson, B.J., Oparil, S., Wright, J.T. & Roccella, E.J. 2003. National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee: The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: the JCN7 report. *JAMA* 289:2560-2572.
- Choe, E. & Min, D.B. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comp. Food Sci. Food Saf. Rev.* 5: 169-186.
- Choe, E. & Min, D.B. 2007. Chemistry and reactions of deep-fat frying oils. *J. Food Sci.* 72 (5): R77-R86.
- Connelly, T., Ahern, C., Sukhareva, M. & Coronado, R. 1994. Removal of Mg²⁺ inhibition of cardiac ryanodine receptor by palmitoyl coenzyme A. *FEBS Lett* 352:285–290.
- Danaei, G., Ding, E.L., Mozaffarian, D., Taylor, B., Rehm, J., Murray, C.J.L. & Ezzati, M. 2009. The preventable causes of death in the United States: Comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. *PLoS Med.* 6(4): e1000058.
- David Kritchevsky, Shirley A Tepper, Susanne K Czarneck & Kalyana Sundram. 2002. Red palm oil in experimental atherosclerosis. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 11(Suppl): S433–S437.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R. & Paredes-Lopez, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci. Nutr.* 40 (3): 173-289.

- Diebolt, M., Bucher, B. & Andriantsitohaina, R. 2001. Wine Polyphenols Decrease Blood Pressure, Improve NO Vasodilatation, and Induce Gene Expression. *Hypertension* 38: 159-165.
- Donald J. McNamara, 2000. Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1529: 310-320.
- Du, M., Nam, K. C. & Ahn, D.U. 2001. Cholesterol and lipid oxidation products in cooked meat as affected by raw-meat packaging and irradiation and by cooked-meat packaging and storage time. *J. Food Sci.* 66 (9): 1396-1401.
- Ebbert, J.O. & Jensen, M.D. 2013. Fat Depots, Free Fatty Acids, and Dyslipidemia. *Nutrients* 5: 498-508; doi:10.3390/nu5020498.
- Edem, D.O. 2002. Palm oil: Biochemical, physiological and toxicological aspects: A review. *Plant Food Hum Nutr.* 57, 319-341.
- Elaine N. Marieb, 2013. Human Anatomy & Physiology, Sixth Edition, Publisher: Benjamin-Cummings. pp 82-91.
- Erickson, R. 2000. Handbook of soy oil: processing and utilization. St. Louis, Mo: American Soybean Association; Champaign, Ill.: American Oil Chemists' Society.
- Eugene Herman, Alan Knapton, Jun Zhang, Joel Estis, John Todd & Steven Lipshultz. 2014. The utility of serum biomarkers to detect myocardial alterations induced by Imatinib in rats. *Pharma. Res.* 2 (1): 1-9.
- Fabroni, S., Ballistreri, G., Amenta, M. & Rapisarda, P. 2016. Anthocyanins in different Citrus species, an UHPLC-PDA-ESI/MS -assisted qualitative and quantitative investigation. *J. Sci. Food Agric.* Jul 20. doi: 10.1002/jsfa.7916.
- Farag Radwan, Abdel-Latif, S., Mohamed, S. 2010. Effect of non-fried and fried oils of varied fatty acid composition on rat organs. *Agrand Biol. J. North Am.* 1 (4): 501-509.
- Fernandez, M.L. & Volek, J.S. 2006. Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond)* 27:3-17.
- Frank H. Netter & John T. Hansen. 2012. Atlas of Human Anatomy, Third Edition Publisher: ICON Learning Systems. pp 67-74.
- Frostegard, J., Ulfgren, A.K., Nyberg, P., Hedin, U., Swedenborg, J., Andersson, U., Hansson, G.K., 1999. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic

plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 145:33–43.

Ganesan Kumar, Gani Sharmila Banu, Arunachalam Ganesan Murugesan. 2008. Effect of *Helicteres isora* bark extracts on heart antioxidant status and lipid peroxidation in streptozotocin diabetic rats. *J. Appl. Biomed.* 6: 89–95.

Gilbert, E.M. & Bristow, M.R. 1994. Idiopathic dilated cardiomyopathy. In: Schlant RC, Alexander RW, eds. *Hurst's The Heart: Arteries and Veins*. New York, NY: McGraw-Hill Inc; 1609–1619.

Gimbrone, M.A., Jr, Topper, J.N., Nagel, T., Anderson, K.R. & Garcia-Cardena, G. 2000. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* 902:230–239.

Giordano, F.J. 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *Journal of clinical investigation* 115: 500-508.

Goh, S.H. & Gee, P.T. 2006. Non-carotenoid hydrocarbons in palm oil and palm fatty acid distillate. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 63, 226-230.

Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., Fiers, W. 1995. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8115–8119.

Granada, J.F., Kaluza, G.L., Wilensky, R.L. 2009. Porcine models of coronary atherosclerosis and vulnerable plaque for imaging and interventional research. *Euro Intervention* 5:140–148.

Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106: 207-212.

Guido, M. & Isabelle, J. 2004. *Principles of General Pathology: Cells, Tissues, and Disease*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 2nd edition.

Halliwell, B. & J.M.C. Gutteridge, 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 1:1396–1397.

Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S. & Aruoma, O. I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35 (1&2): 7-20.

- Hamsi, M.A., Faizah Othman, Srijit Das, Yusof Kamisah, Zar Chi Thent, Haji Mohd Saad Qodriyah, Zaiton Zakaria, Adel Emran, Kogilavani Subermaniam, Kamsiah Jaarin. 2015. Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and inflammatory biomarkers: An experimental study in Sprague Dawley rats. *51 (1): 53–63.*
- Hanson, D. G., Juhn, S. K., Giebink, G. S. & Paparella, M. M. 1978. Lactate dehydrogenase as a measure of inflammation in experimental otitis media. *Arch. Otolaryngol.* 104(6): 333-335.
- Harrison, D.G., Gongora, M.C., Guzik, T.J., Widder, J. 2007. Oxidative stress and hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* 1:30–44.
- Hazura, A.H. & Choo, Y.H. 2006. Proceedings of World Conference on Oil Seeds. Istanbul 2: 250-252.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13 (10):572-584.
- Hidalgo, F. J., Nogales, F. & Zamora, R. 2005. Changes produced in the antioxidative activity of phospholipids as a consequence of their oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 53: 659-662.
- Hoshino, T., Fujiwara, H., Hawai, C. & Hamashima, Y. 1983. Myocardial fiber diameter and regional distribution in the ventricular wall of normal adult heart, hypertensive hearts and hearts with hyperthrophic cardiomyopathy. *Circulation* 65(5): 1109-1116.
- Jaarin, K., Mustafa, M.R. & Leong, X.F. 2011. The effects of heated vegetable oils on blood pressure in rats. *Clinics* 66(12):2125-2132.
- Jelinek, D., Castillo, J.J., Richardson, L.M., Luo, L., Heidenreich, R.A. & Garver, W.S. 2012. The Niemann-Pick C1 gene is downregulated in livers of C57BL/6J mice by dietary fatty acids, but not dietary cholesterol, through feedback inhibition of the SREBP pathway. *J. Nutr.* 142(11):1935-1942.
- Jensen, M.D. 2008. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93:S57–S63.
- Johann Auer, M.D., Robert Berent, M.D., Elisabeth Lassnig, M.D. & Bernd Eber, M.D. 2002. C-reactive protein and coronary artery disease. *Jpn Heart J.* 43:607–619.

- Johnson, F. C. 2009. The antioxidant vitamins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 11(3): 217-309.
- Kakkar, P., Das, B. & Viswanathan, P.N. 1984. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J. Biochem. Biophys.* 21:130-132.
- Kankaanpaa, M., Lehto, H.R., Parkka, J.P., Komu, M., Viljanen, A., Ferrannini, E., Knuuti, J., Nuutila, P., Parkkola, R. & Iozzo, P. 2006. Myocardial triglyceride content and epicardial fat mass in human obesity: relationship to left ventricular function and serum free fatty acid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 91(11):4689–4695.
- Kashyap, M.K., Yadav, V., Sherawat, B.S., Jain, S., Kumari, S., Khullar, M., Sharma, P.C. & Nath, R. 2005. Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hypertension. *Mol. Cell Biochem* 277:89-99.
- Khan, M. A. & F. Shahidi. 2001. Effects of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols. *Food Chem.* 75 (4): 431-437.
- Kochhar, S. P. & Gertz, C. 2004. New theoretical and practical aspects of the frying process. *Eur J Lipid Sci Technol.* 106 (11):722-727.
- Koh, K.K. 2002. Effects of estrogen on the vascular wall: vasomotor function and inflammation. *Cardiovasc. Res.* 55:714-26.
- Lauralee Sherwood, 2011. *Fundamentals of Physiology: A Human Perspective*, Publisher: Brooks Cole. pp: 77-85.
- Lauralee Sherwood, 2012. *Human Physiology: From Cells to Systems with Infotrac* Publisher: Wadsworth Pub. pp: 117-124.
- Leonard, B.L., Smaill, B. H. & LeGrice, I. J. 2012. Structural remodelling and mechanical function in heart failure. *Microscopy Microanalysis*, 18: 50-67.
- Leong, X.F, Najib, M.N., Das, S., Mustafa, M.R. & Jaarin, K. 2009. Intake of repeatedly heated palm oil causes elevation in blood pressure with impaired vasorelaxation in rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 219:71–78.
- Leong, X.F, Salimon, J., Mustafa, M.R. & Jaarin K. 2012. Intake of repeatedly heated palm olein on blood pressure regulating enzymes activity and lipid peroxidation in rats. *Malay. J. Med. Sci.* 19:20-29.
- Leong, X.F., Aishah, A., Nor Aini, U., Das, S. & Jaarin, K. 2008. Heated palm oil causes rise in blood pressure and cardiac changes in heart muscle in experimental rats. *Arch. Med. Res.* 39(6):567-572.

- Leong, X.F., Mustafa, M.R., Das, S. & Jaarin, K. 2010. Association of elevated blood pressure and impaired vasorelaxation in experimental Sprague-Dawley rats fed with heated vegetable oil. *Lipids Health Dis*9:66.
- Li, S-H., Zhao, P., Tian, H-B., Chen, L-H. & Cui, L-Q. 2015. Effect of Grape Polyphenols on Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE*, 10 (9): e0137665.
- Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G.K. 2009. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am. Coll. Cardiol.*54 (23): 2129–2138.
- Liu, K., Wang, W., Guo, B.H., Gao, H., Liu, Y., Liu, X.H., Yao, H.L. & Cheng, K. 2016. Chemical Evidence for Potent Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Ethyl Acetate Extract of Citrus aurantium L. Dried Immature Fruits. *Molecul.* 21(3):302. doi: 10.3390/molecules21030302.
- Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Jamison, D.T. & Murray, C.J.L. 2006. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*367:1747-1757.
- Lusis, A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-41.
- Ma, Q.G., Xu, K., Sang, Z.P., Wei, R.R., Liu, W.M., Su, Y.L., Yang, J.B., Wang, A.G., Ji, T.F. & Li, L.J. 2016. Alkenes with antioxidative activities from *Murraya koenigii* (L.) Spreng. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26(3):799-803. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.12.091.
- Mandarim-de-Lacerda, C.A. & Meirelles Pereira, L.M. 2000. Numerical density of cardiomyocytes in chronic nitric oxide synthesis inhibition. *Pathobiol.* 68: 36-42.
- Manonmani, G., Anbarasi, K., Balakrishna, K., Veluchamy, G. & Shyamala Devi, C.S. 2002. Effect of Terminalia arjuna on the antioxidant defense system in alloxan induced diabetes in rats. *Biomed.* 22:52–61.
- Marieb, E.N. & Hoehn, K.N. 2012. Human Anatomy & Physiology / Edition 9, Pearson Publisher. pp 112-135.
- Matsumori, A., Yamada, T., Suzuki, H., Matoba, Y. & Sasayama, S. 1994. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J.* 72:561–566.
- Maxwell, S.R.J. & Lip, G.Y.H. 1997. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 44(4): 307–317.
- Micha, R. & Mozaffarian, D. 2010. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke and diabetes: A fresh look at the evidence. *Lipids*45: 893-905.

- Min, D.B. & Lee, H.O. 2009. Flavor chemistry: 30 years of progress, edited by Teranishi et al. NY, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 175-187.
- Mohamed, S. & Nor, F.M. 2013. Patent number.US 8425969 B2; PCT/MY2008/000066.
- Morin, R.J., Hu, B., Peng, S.K. & Sevanian, A. 2001. Cholesterol oxides and carcinogenesis. *J. Clin. Lab. Anal.* 5: 219-225.
- Morton, D. & Perry, J.W. 2013. Photo Atlas for Anatomy and Physiology, Publisher: Brooks Cole.
- Nafeeza, M.I., Norzana, A.G., Kamsiah, J., Jalaluddin, H.K. & Gapor, M.T. 2000. Vitamin E and factors affecting atherosclerosis in rabbits fed a cholesterol-rich diet. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 51: 81-96.
- Nalli, Y., Khajuria, V., Gupta, S., Arora, P., Riyaz-Ul-Hassan, S., Ahmed, Z. & Ali, A. 2016. Four new carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* that display anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Org. Biomol. Chem.* 14(12):3322-3332. doi: 10.1039/c6ob00267f.
- Nevin, K.G. & Rajamohan, T. 2006. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. *J. Clin. Food Chem.* 99, 260-266.
- Ng, C.Y., Yusof, K., Othman, F., Jubri, Z., Hj Mohd Saad, Q. & Jaarin, K. 2012. Involvement of inflammation and adverse vascular remodeling in the blood pressure raising effect of repeatedly heated palm oil in rats. *Inter. J. Vasc. Med.* 12: 10 pages.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., van Norren, K. & van Leeuwen. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74 (4): 418-425.
- O'Brien, P. J. 2006. Blood cardiac troponin in toxic myocardial injury: Archetype of a translational safety biomarker. *Expert Rev Mol Diagn* 6: 685-702.
- O'Brien, P. J. 2008. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicol.* 245: 206-218.
- Ogunro, P.S., Bolarinde, A.A., Owa, O.O., Salawu, A.A. & Oshodi, A.A. 2014. Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and postmenopausal phase of life. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 43(1):49-57.
- Okhawa, H., Ohishi, N. & Yogi, K. 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annal Biochem.* 95:351-358.

- Osim, E.E., Owu, D.U., Isong, E.U. & Umoh, I.B. 1994. Influence of chronic consumption of thermooxidized and fresh palm oil diets on basal metabolic rate, body weight and morphology of tissue in rats. *Discov. Innov.* 6:389-396.
- Owu, D.U., Osim, E.E. & Ebong, P.E. 1998. Serum liver enzymes profile of Wistar rats following chronic consumption of fresh or oxidized palm oil diets. *Acta Trop.* 69:65-73.
- Ozawa, T. 1999. Mitochondria in cellular aging and degeneration. In: Cadenas E, Packer L, eds. *Understanding the Process of Aging: The Roles of Mitochondria, Free Radicals and Antioxidants*. New York: Marcel Dekker; 265-292.
- Oziewicz, M.D. & Tymoszczyk, M.K. 2005. Quality changes in selected frying fats during heating in a model system. *J Food Lipids* 12:159-168.
- Packer, L., Weber, U. S. & Rimbach, G. 2001. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *J Nutr.* 131:369-373.
- Pai, J.K., Pischon, T. & Ma, J. 2004. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *NEJM* 351:2599-2610.
- Paniangvait, P., King, A. J., Jones, A. D. & German. B. G. 1995. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* 60: 1159-1174.
- Pasceri, V., Willerson, J. & Yeh, E. 2000. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 102:2165-2178.
- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F.J., Nicol, R.L., McKinsey, T.A., Overbeek, P., Richardson, J.A., Grant, S.R. & Olson, E.N. 2000. CaM kinase signalling induce cardiachypertrophy and activates the MEF2 transcription factor *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 105(10): 1395-1405.
- Patel, O.P., Mishra, A., Maurya, R., Saini, D., Pandey, J., Taneja, I., Raju, K.S. & Yadav PP. Naturally Occurring Carbazole Alkaloids from *Murraya koenigii* as Potential Antidiabetic Agents. *J. Nat. Prod.* 79(5):1276-84. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00883.
- Patil, S.B., Kodliwadmath, M.V. & Kodliwadmath, S.M. 2008. Correlation between lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidants in pregnancy induced hypertension. *Indian J. Clin. Biochem.* 23:45-48.
- Paul, S. & Mittal, G.S. 1997. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37 (7): 635-662.

- Petron, M. J., Garcia-Regueiro, J. A., Martin, L., Muriel, E. & Antequera, T. 2003. Identification and quantification of cholesterol and cholesterol oxidation products in different types of Iberian hams. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5786-5791.
- Plat, J., van. Onselen, E. N., van Heugten, M. M. & Mensink, R. P. 2000. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant sterol esters. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54 (9): 671-677.
- Quinn, M. T., Parthasarathy S., Fong, L.G. & Steinberg, D. 1987. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84(9): 2995-2998.
- Rahman, A., Imran, H., Iqbal, L., STaqvi, S.I., Fatima, N., Yaqeen, Z. 2016. Dry and ripe fruit of *Aegle marmelos*. L: A potent source of antioxidant, lipoxygenase inhibitors and free radical scavenger. *Pak. J. Pharm. Sci.* 29(4):1127-31.
- Rani, A.K.S., Reddy, S.Y. & Chetana, R. 2010. Quality changes in trans and trans free fats/oils and products during frying. *Eur. Food Res. Technol.* 230(6): 803-811.
- Reingold, J.S., McGavock, J.M., Kaka, S., Tillery, T., Victor, R.G. & Szczepaniak, L.S. 2005. Determination of triglyceride in the human myocardium by magnetic resonance spectroscopy: reproducibility and sensitivity of the method. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289(5):E935-E939.
- Ridke, P.M., Rifai, N., Rose, L., Buring, J.E. & Cook, N.R. 2003. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 347:1557-65.
- Ridker, P.M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F. & Lepage, S. 2000. Braunwald E: Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 101:2149-2155.
- Risenfors, M., Hartford, M., Dellborg, M., Luepker, R., Hjalmarsson, K. & Swedberg, K. 1991. Effect of early intravenous rt-PA on infarct size estimated from serum enzyme activity: results from the TEAHAT study. *J Intern Med Suppl* 734:11-18.
- Romero-Alvira, D. & Roche, E. 1996. High blood pressure, oxygen radicals and antioxidants: etiological relationship. *Med Hypothesis* 46:414-420.
- Sabri, A., Hughie, H.H. & Luchchesi, P.A. 2003. Regulation hypertrophic and apoptotic signalling pathway by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxi. Redox signal.* 5(6): 713-740.

- Sánchez-Rodríguez, M.A., Zacarías-Flores, M., Arronte-Rosales, A., Correa-Muñoz, E. & Mendoza-Núñez, V.M. 2012. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause*. 19(3): 361-367.
- Schmitz-Peiffer, C. 2000. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal* 12:583–594.
- Schoen, F.J. 2005. Blood vessels. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 511-54.
- Schuler, P. 2000. Natural antioxidants exploited commercially, in food antioxidants, Hudson, B. J. F., Ed., Elsevier, and Amsterdam. 99-108.
- Serbinova, E., Kagan, V., Han, D. & Packer, L. 1991. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Rad. Biol. Med.* 10(5): 263–275.
- Sesso, H.D., Buring, J.E. & Rifai, N., 2003. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 290:2945–2951.
- Shahidi, F. & Wansaundara. P.K.J.P.D. 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32 (1): 67-103.
- Sharma, C.K., Sharma, M., Sharma, V. 2016. Therapeutic Potential of the Medicinal Plant *Aegle Marmelos* (Linn.) Correa: Insight. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 35(1):1-10. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2015014485.
- Shastry, C.S., Narendrakumar Ambalal, P. & Himonshu, J. 2011. Evaluation of effect of reused edible oil on vital organs of wister rats. *Nitte Univ. Hlth. Sci.* 1: 10-15.
- Sonnenblick, E.H. & Anversa, P. 1999. Models and remodeling: Mechanisms and clinical implication. *Cardiol.* 44, 609-619.
- Stocker, R. & Keaney, J.F. Jr. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 84:1381-478.
- Subagio, A. & Morita, N. 2001. Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. *Food Res.Int.* 34 (2-3): 183-188.
- Subermaniam, K., Saad, Q.J.M., Das, S. & Othman, F. 2014. Virgin Coconut Oil (VCO) Decreases the Level of Malondialdehyde (MDA) in the Cardiac Tissue of Experimental Sprague-Dawley Rats Fed with Heated Palm Oil. *J. Med. Bioengineer.* 3:102-106.

- Sukalingam, K., Faizah Othman, Saad, Q.H.M., Mohamed, S. & Jaarin, K. 2016. Consumption of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the blood pressure and oxidative stress markers in ovariectomized rats. *Int J. Pharmacol.* 12: 514-522.
- Susan Standring, 2010. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, Publisher: C.V. Mosby. pp 88-110.
- Szmitko, P.E., Wang, C.H., Weisel, R.D., de Almeida, J.R., Anderson, T.J., Verma, S. 2003. New markers of inflammation and endothelial cell activation: part I. *Circulation* 108:1917-23.
- Takeuchi, H., Sekine, S., Kojima, K., Aoyama, T. 2008. The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17:320–323.
- Tanaka, M., Fujiwara, H., Onodera, T., Wu, D.J., Hamashima, Y. & Kawai, C. 1986. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normal, hypertensive hearts and hypertrophic cardiomyopathy. *Br. Heart J.* 55: 575-581.
- Thompson, A.L. & Cooney, G.J. 2000. Acyl-CoA inhibition of hexokinase in rat and human skeletal muscle is a potential mechanism of lipid-induced insulin resistance. *Diabetes* 49:1761–1765.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, Jaffe, A. S., Apple, F. S., Galvani, M., Katus, H. A., Newby, L. K., Ravkilde, J., Chaitman, B., Clemmensen, P. M., Dellborg, M., Hod, H., Porela, P., Underwood, R., Bax, J. J., Beller, G. A., Bonow, R., Van der Wall, E. E., Bassand, J. P., Wijns, W., Ferguson, T. B., Steg, P. G., Uretsky, B. F., Williams, D. O., Armstrong, P. W., Antman, E. M., Fox, K. A., Hamm, C. W., Ohman, E. M., Simoons, M. L., Poole-Wilson, P. A., Gurfinkel, E. P., Lopez-Sendon, J. L., Pais, P., Mendis, S., Zhu, J. R., Wallentin, L. C., Fernandez-Aviles, F., Fox, K. M., Parkhomenko, A. N., Priori, S. G., Tendera, M., Voipio-Pulkki, L. M., Vahanian, A., Camm, A. J., De Caterina, R., Dean, V., Dickstein, K., Filippatos, G., Funck-Brentano, C., Hellems, I., Kristensen, S. D., McGregor, K., Sechtem, U., Silber, S., Tendera, M., Widimsky, P., Zamorano, J. L., Morais, J., Brener, S., Harrington, R., Morrow, D., Lim, M., Martinez-Rios, M. A., Steinhilb, S., Levine, G. N., Gibler, W. B., Goff, D., Tubaro, M., Dudek, D., Al-Attar, N. 2007. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 116: 2634–53.
- Torre-Amione, G., Kapadia, S., Benedict, C., Oral, H., Young, J.B, Mann, D.L. 1996. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 27:1201–1206.

- Torzewski, M., Rist, C., Mortensen, R., Zwaka, T.P., Bienek, M., Waltenberger, J., Koenig, W., Schmitz, G., Hombach, V., Torzewski, J. 2000. C-reactive protein in the arterial intima. Role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arteriosc. Thromb. Vasc. Biol.* 20:2094-2109.
- Totani, N. & Ojiri, Y. 2007. Mild ingestion of used frying oil damages hepatic and renal cells in Wistar rats. *J OleoSci.* 56:261–267.
- Unger, R.H., Orci, L. 2001. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* 15:312–332.
- Vaishali, S., Singh, S., Neelima, S., Shaila, S. 2005. Status of antioxidant enzymes and trace metals in postmenopausal women. *J. Obstet. Gynecol. Ind.* 55(1): 64-66.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J. & Nieto, S. 2002. Effect of synthetic antioxidants on cholesterol stability during the thermal-induced oxidation of a polyunsaturated vegetable oil. *J. Am Oil Chem. Soc.* 79 (4): 325-328.
- Van der Meer, R.W., Hammer, S., Smit, J.W., Frolich, M., Bax, J.J., Diamant, M., Rijzewijk, L.J., de Roos, A., Romijn, J.A., Lamb, H.J. 2007. Short-term caloric restriction induces accumulation of myocardial triglycerides and decreases left ventricular diastolic function in healthy subjects. *Diabetes* 56(12):2849–2853.
- Verma, S., Buchanan, M.R. & Anderson, T.J. 2003. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 108:2054-2059.
- Vincent, H.K., Powers, S.K., Dirks, A.J. & Scarpance, P. 2001. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid per-oxidation. *Int. J. Obes.* 25 :373-378.
- Warner, K. 2005. Effects on the flavor and oxidative stability of stripped soybean and sunflower oils with added pure tocopherols. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9906-9910.
- WHO, 2008. International Cardiovascular Disease Statistics. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (21 March 2016).
- WHO, 2009. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks Geneva
http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf (10 April 2016).

- WHO, 2015. Cardiovascular diseases: Global status report on non-communicable diseases 2014, Fact sheet N°317. http://www.world-heart-federation.org/fileadmin/user_upload/documents/Publications/Global_CVD_Atlas.pdf. (4 April 2016).
- Wohaieb, S.A., Godin, D.V. 1987. Alterations in free radical tissue defense mechanisms in streptozotocin induced diabetes in rat: effects of insulin treatment. *Diabetes* 36:169–173, 1987.
- World Vegetable & Marine oil Consumption, 2007. World Statistics, USDA, pp. 10. <http://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/> (12 February 2016).
- Yadav, S., Boddula, R., Genitta, G., Bhatia, V., Bansal, B., Kongara, S., Julka, S., Kumar, A., Singh, H.K., Ramesh, V., Bhatia, E. 2008. Prevalence & risk factors of prehypertension & hypertension in an affluent north Indian population. *Indian J. Med. Res.* 128:712-720.
- Yayan, J. 2013. Emerging families of biomarkers for coronary artery disease: inflammatory mediators. *Vasc. Health Risk Manag.* 9:435–456.
- Yoshikawa, T., Naho, Y., Kishi, A., Tomil Kaneko, T., Inuma, S., Ichikawa, H., Yasudha, M., Takahshi, S., Kondo, M. 1993. Role of active oxygen, lipid peroxidation and antioxidants in the pathogenesis gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 34:732–737.
- Young, M.E., Patrick H. Guthrie, Peter Razeghi, Brendan Leighton, Shahrzad Abbasi, Sarita Patil, Keith A. Youker, & Heinrich Taegtmeier, 2002. Impaired Long-Chain Fatty Acid Oxidation and Contractile Dysfunction in the Obese Zucker Rat Heart. *Diabetes* 51:2587–2595.
- Zhao, J.R. & Erdman J.W. 1995. Phytic acid in health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35(6): 495-508
- Zitvogel, L., Kepp, O. & Kroemer, G. 2010. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* 140: 798–804.

LAMPIRAN A

Sijil Kelulusan Etika Kajian Haiwan (UKMAEC)


**UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
ANIMAL ETHICS COMMITTEE**

c/o Laboratory Animal Resource Unit
Faculty of Medicine, UKM
Jalan Raja Muda Abdul Aziz 50300 Kuala Lumpur
Tel: 92895086, 92895091, 92895087 Fax: 603-29683743

26th November, 2014

UKMAEC APPROVAL NUMBER: FP/ANAT/2014/FAIZAH/26-NOV./634-NOV.-2014-SEPT.-2015

CHIEF INVESTIGATOR: Assoc. Prof. Dr. Faizah Othman

DIVISION/DEPT. OF CHIEF INVESTIGATOR: Department of Anatomy, Faculty of Medicine, UKM.

FUNDING INSTITUTION (S): UKM

GRANT NUMBER (S): -

PROJECT TITLE: 1) Effect of ADD-X extract on the aorta of ovariectomised atherosclerotic rat model.
2) Effect of ADD-X extract on cardiac tissue in ovariectomised Sprague-Dawley rats.

CO-INVESTIGATOR: Assoc. Prof. Dr. Kamisah Jaarin
Prof. Dr. Fariah Hj. Suhaimi
Assoc. Prof. Dr. Qodriyah Hj. Mohd Saad
Dr. Sahema @ Zar Chi Thent

STUDENT: Kumeshini Sukalingam
Nurshazana Akmal Jamaludin

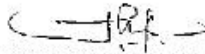
OTHER AUXILIARIES: -

PROJECT CLASSIFICATION: C

SOURCE OF ANIMALS: LARU, UKM.

HOUSING-LOCATION OF ANIMALS DURING PROJECT: Dept. of Anatomy, UKM.

ESTIMATED DURATION OF PROJECT: From November 2014 to September 2015


Assoc. Prof. Dr. Kamisah Yusof
Chairperson of UKMAEC
Universiti Kebangsaan Malaysia




Low Kiat Cheong
Secretary of UKMAEC
Universiti Kebangsaan Malaysia

LAMPIRAN B

Surat Kelulusan Menjalankan Penyelidikan Di UKM



Jawatankuasa Etika Haiwan (UKMAEC) / Animal Welfare Ethics Committee (UKMAEC)

UKM 1.5.24/138/61/2
18hb. Disember, 2014

UKMAEC
d/a
Unit Sumber Haiwan Makmal
Fakulti Perubatan
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur

Profesor Madya Dr. Faizah Othman,
Jabatan Anatomi,
Fakulti Perubatan,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
Jalan Yaacob Latiff, Bandar Tun Razak,
56000 Kuala Lumpur.

Puan,

Kelulusan Dari Jawatankuasa Etika Penggunaan Haiwan (UKMAEC) Untuk Tajuk: "1) Effect of ADD-X extract on the aorta of ovariectomised atherosclerotic rat model. 2) Effect of ADD-X extract on cardiac tissue in ovariectomised Sprague-Dawley rats."

Dalam mesyuarat UKMAEC pada 26hb. November, 2014 telah memutuskan bahawa permohonan puan diluluskan. Nombor kelulusan adalah seperti berikut.

FP/ANAT/2014/FAIZAH/26-NOV./634-NOV.-2014-SEPT.-2016

Bersama surat ini kami lampirkan sijil kelulusan dengan bujukan penyelidikan yang berkaitan. Diharap sijil ini dapat dimanfaatkan pada masa hadapan.

Sekian, terima kasih.

Yang benar,

PROFESOR MADYA DR. KAMISAH YUSOF
Pengerusi UKMAEC
Universiti Kebangsaan Malaysia

s.k. - Pengarah CRIM

LAMPIRAN C

Prosedur Kit Bagi Penentuan Katalase (CAT)

Principle:

Catalase Assay Kit utilizes the peroxidatic function of CAT for determination of enzyme activity. The method is based on the reaction of the enzyme with methanol in the presence of an optimal concentration of H_2O_2 . The formaldehyde produced is measured colorimetrically with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1, 2, 4-triazole (Purpald) as the chromogen. Purpald specifically forms a bicyclic heterocycle with aldehydes, which upon oxidation changes from colorless to a purple color. The assay can be used to measure CAT activity in plasma, serum, erythrocyte lysates, tissue homogenates, and cell lysates.

(Catalytic Activity) $2H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_2O$

(Peroxidatic Activity) $H_2O_2 + AH_2 \longrightarrow A + 2H_2O$

Standard Preparation

Preparation of the Formaldehyde Standards - Dilute 10 μ l of Catalase Formaldehyde Standard (Item No. 707014) with 9.99 ml of diluted Sample Buffer to obtain a 4.25 mM formaldehyde stock solution. Take seven clean glass test tubes and mark them A-G. Add the amount of formaldehyde stock and diluted Sample Buffer to each tube as described in Table 1 (below).

Tube	Formaldehyde (μ l)	Sample Buffer (μ l)	Final Concentration (μ M formaldehyde)*
A	0	1,000	0
B	10	990	5
C	30	970	15
D	60	940	30
E	90	910	45
F	120	880	60
G	150	850	75

Table 1

*Final formaldehyde concentration in the 170 μ l reaction.

Performing the Assay

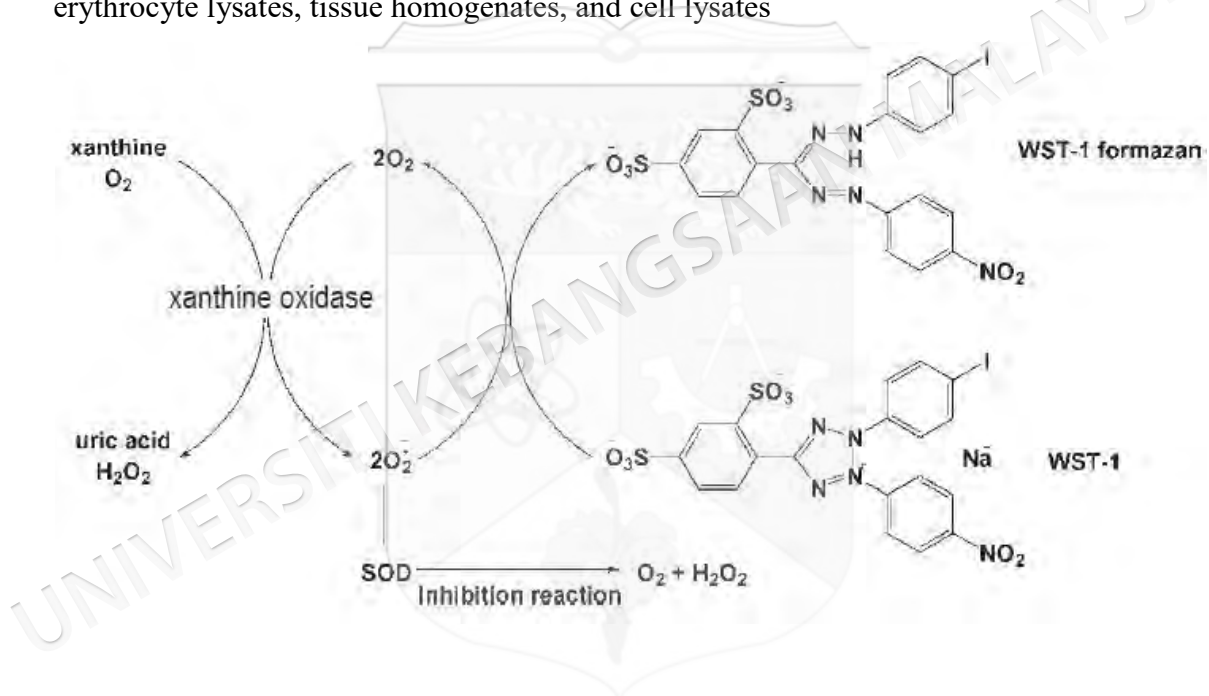
1. **Formaldehyde Standard Wells** - Add 100 μ l of diluted Assay Buffer, 30 μ l of methanol, and 20 μ l of standard (tubes A-G) per well in the designated wells on the plate (see Sample plate format, Figure 1, page 13).
2. **Positive Control Wells (bovine liver CAT)** - Add 100 μ l of diluted Assay Buffer, 30 μ l of methanol, and 20 μ l of diluted Catalase (Control) to two wells.
3. **Sample Wells** - Add 100 μ l of diluted Assay Buffer, 30 μ l of methanol, and 20 μ l of sample to two wells. To obtain reproducible results, the amount of CAT added to the well should result in an activity between 2-35 nmol/min/ml. When necessary, samples should be diluted with diluted Sample Buffer or concentrated with an Amicon centrifuge concentrator with a molecular weight cut-off of 100,000 to bring the enzymatic activity to this level.
4. Initiate the reactions by adding 20 μ l of diluted Hydrogen Peroxide to all the wells being used. Make sure to note the precise time the reaction is initiated and add the diluted Hydrogen Peroxide as quickly as possible.
5. Cover the plate with the plate cover and incubate on a shaker for 20 minutes at room temperature.
6. Add 30 μ l of Potassium Hydroxide to each well to terminate the reaction and then add 30 μ l of Catalase Purpald (Chromogen) (Item No. 707017) to each well.
7. Cover the plate with the plate cover and incubate for 10 minutes at room temperature on the shaker.
8. Add 10 μ l of Catalase Potassium Periodate (Item No. 707018) to each well. Cover with plate cover and incubate five minutes at room temperature on a shaker.
9. Read the absorbance at 540 nm using a plate reader.

LAMPIRAN D

Prosedur Kit Bagi Penentuan Superoksida Dismutase (SOD)

Principle

Superoxide Dismutase Assay Kit utilizes a tetrazolium salt for detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical. The SOD assay measures all three types of SOD (Cu/Zn, Mn, and FeSOD). The assay provides a simple, reproducible, and fast tool for assaying SOD activity in plasma, serum, erythrocyte lysates, tissue homogenates, and cell lysates



Standard Preparation

Dilute 20 μl of the SOD Standard (Item No. 706005) with 1.98 ml of Sample Buffer (dilute) to obtain the SOD stock solution. Take seven clean glass test tubes and mark them A-G. Add the amount of SOD stock and Sample Buffer (dilute) to each tube as described in Table 1 below.

Tube	SOD Stock (μl)	Sample Buffer (μl)	Final SOD Activity (U/ml)
A	0	1,000	0
B	20	980	0.005
C	40	960	0.010
D	80	920	0.020
E	120	880	0.030
F	160	840	0.040
G	200	800	0.050

Table 1. Superoxide Dismutase standards

Performing the Assay

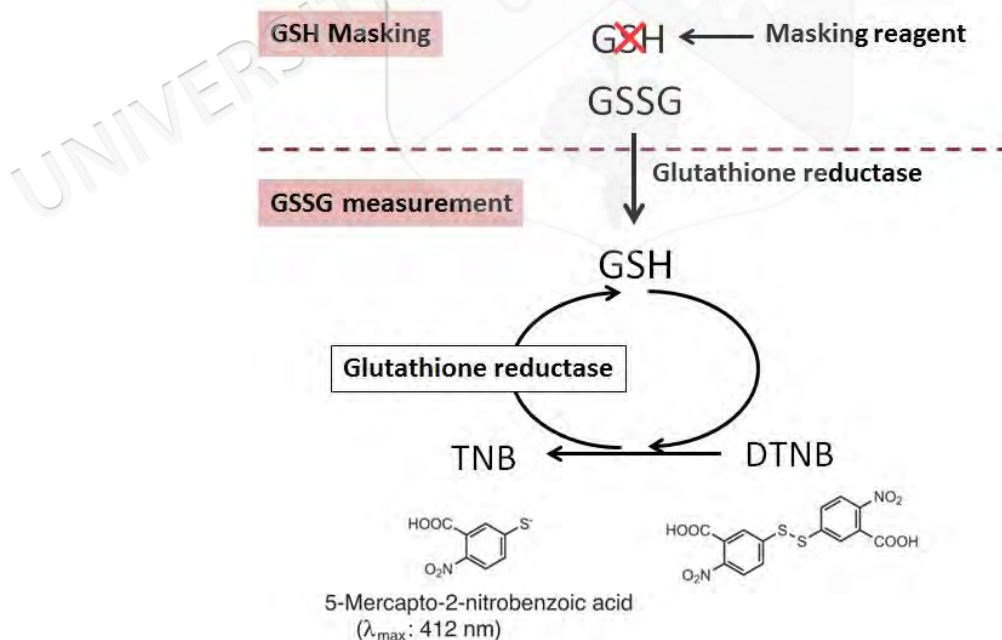
1. **SOD Standard Wells** - add 200 μl of the diluted Radical Detector and 10 μl of Standard (tubes A-G) per well in the designated wells on the plate (see Sample plate format, Figure 2, page 12).
2. **Sample Wells** - add 200 μl of the diluted Radical Detector and 10 μl of sample to the wells. *NOTE: If using an inhibitor, add 190 μl of the diluted Radical Detector, 10 μl of inhibitor, and 10 μl of sample to the wells. The amount of sample added to the well should always be 10 μl . Samples should be diluted with Sample Buffer (dilute) or concentrated with an Amicon centrifuge concentrator with a molecular weight cut-off of 10,000 to bring the enzymatic activity to fall within the standard curve range.*
3. Initiate the reactions by adding 20 μl of diluted Xanthine Oxidase to all the wells you are using. Make sure to note the precise time you started and add the Xanthine Oxidase as quickly as possible. *NOTE: If assaying sample backgrounds, add 20 μl of Sample Buffer instead of Xanthine Oxidase.*
4. Carefully shake the 96-well plate for a few seconds to mix. Cover with the plate cover.
5. Incubate the plate on a shaker for 30 minutes at room temperature. Read the absorbance at 440-460 nm using a plate reader.

LAMPIRAN E

Procedur Kit Bagi Penentuan Glutathione (GSH)

Principle

GSH Assay utilizes a carefully optimized enzymatic recycling method, using glutathione reductase, for the quantification of GSH. The sulfhydryl group of GSH reacts with DTNB (5, 5'-dithio-bis-2-(nitrobenzoic acid), Ellman's reagent) and produces a yellow colored 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). The mixed disulfide, GSTNB (between GSH and TNB) that is concomitantly produced, is reduced by glutathione reductase to recycle the GSH and produce more TNB. The rate of TNB production is directly proportional to this recycling reaction which is in turn directly proportional to the concentration of GSH in the sample. Measurement of the absorbance of TNB at 405-414 nm provides an accurate estimation of GSH in the sample. GSH is easily oxidized to the disulfide dimer GSSG. GSSG is produced during the reduction of hydroperoxides by glutathione peroxidase. GSSG is reduced to GSH by glutathione reductase and it is the reduced form that exists mainly in biological systems. Since glutathione reductase is used in the Cayman GSH assay, both GSH and GSSG are measured and the assay reflects total glutathione.



Standard Preparation

Take eight clean test tubes and mark them A-H. Aliquot the GSSG Standard (Item No. 703014) and MES Buffer to each tube as described in Table 1.

Tube	GSSG Standard (μl)	MES Buffer (μl)	Final Concentration (μM GSSG)	Equivalent Total GSH (μM)*
A	0	500	0	0
B	5	495	0.25	0.5
C	10	490	0.5	1.0
D	20	480	1.0	2.0
E	40	460	2.0	4.0
F	80	420	4.0	8.0
G	120	380	6.0	12.0
H	160	340	8.0	16.0

Table 1. Glutathione standards

*Under the assay conditions GSSG is reduced to produce 2 mole equivalents of GSH.

Performing the Assay

1. Add 50 μl of Standard (tubes A-H) per well in the designated wells on the plate (see Sample Plate Format, Figure 2, page 14).
2. Add 50 μl of sample to each of the sample wells.
3. Cover the plate with the plate cover provided.
4. Prepare the Assay Cocktail by mixing the following reagents in a 20 ml vial: MES Buffer (11.25 ml), reconstituted Cofactor Mixture (0.45 ml), reconstituted Enzyme Mixture (2.1 ml); water (2.3 ml), and reconstituted DTNB (0.45 ml). *NOTE: The volumes of reagents given are for the use of the entire plate. Adjust the volumes of the reagents accordingly if only a part of the plate is used. Prepare fresh Assay Cocktail and run a standard curve each time the assay is performed. Use the Assay Cocktail within 10 minutes of preparation.*
5. Remove the plate cover and add 150 μl of the freshly prepared Assay Cocktail to each of the wells containing standards and samples using a multichannel pipette. Replace the plate cover. Incubate the plate in the dark on an orbital shaker until measured as outlined below.
6. GSH concentration of the samples can be determined either by the End Point Method or the Kinetic Method. The End Point Method is adequate for most purposes. However, if the levels of cysteine or other thiols in the samples are expected to be significant compared to GSH, the Kinetic Method should be used.

End Point Method: Read the plate at 405-414 nm after 25 minutes.

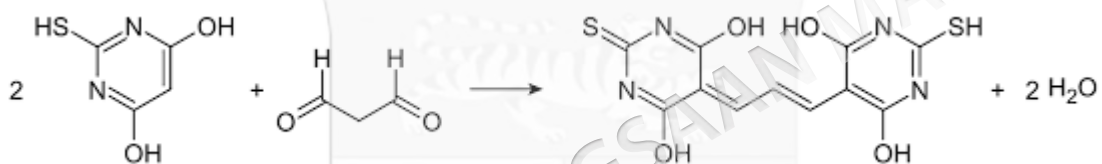
Kinetic Method: Read the plate at 405-414 nm at five minutes intervals for 30 minutes.

LAMPIRAN F

Prosedur Kit Bagi Penentuan *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS)

Principle

TBARS Assay Kit provides a simple, reproducible, and standardized tool for assaying lipid peroxidation in plasma, serum, urine, tissue homogenates, and cell lysates. The MDA-TBA adduct formed by the reaction of MDA and TBA under high temperature (90-100°C) and acidic conditions is measured colorimetrically at 530-540 nm or fluorometrically at an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 550 nm. Although this reaction has a much higher sensitivity when measured fluorometrically, protocols for both methods are provided



Fluorometric Standard Preparation

Dilute 25 μl of the MDA Standard (Item No. 10009202) with 975 μl of water to obtain a stock solution of 12.5 μM . Take eight clean glass test tubes and label them A-H. Add the amount of 12.5 μM MDA stock solution and water to each tube as described in Table 2.

Tube	MDA (μl)	Water (μl)	MDA Concentration (μM)
A	0	1,000	0
B	5	995	0.0625
C	10	990	0.125
D	20	980	0.25
E	40	960	0.5
F	80	920	1
G	200	800	2.5
H	400	600	5

Table 2. MDA fluorometric standards

Performing the Assay

1. Label vial caps with standard number or sample identification number.
2. Add 100 μl of sample or standard to appropriately labeled 5 ml vial.
3. Add 100 μl of SDS Solution to vial and swirl to mix.
4. Add 4 ml of the Color Reagent forcefully down side of each vial.
5. Cap vials and place vials in foam or some other holder to keep the tubes upright during boiling.
6. Add vials to vigorously boiling water. Boil vials for one hour.
7. After one hour, immediately remove the vials and place in ice bath to stop reaction. Incubate on ice for 10 minutes.
8. After 10 minutes, centrifuge the vials for 10 minutes at 1,600 x g at 4°C. Vials may appear clear or cloudy. Cloudiness will clear upon warming to room temperature.
9. Vials are stable at room temperature for 30 minutes.
10. Load 150 μl (in duplicate) from each vial to either the clear plate (colorimetric version) or to the black plate (fluorometric version).
11. Read the absorbance at 530-540 nm or read fluorescence at an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 550 nm.

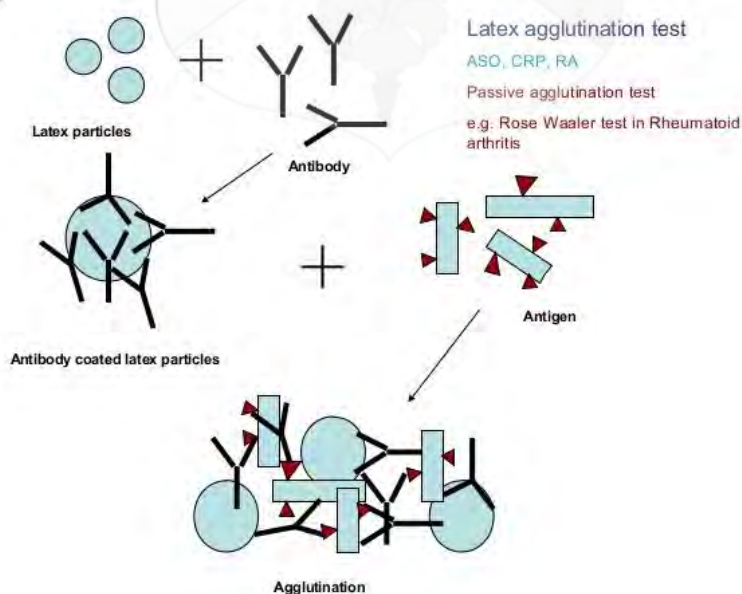
LAMPIRAN G

Kit Prosedur Bagi Penentuan *C - reactive protein* (CRP)

Principle

This immunometric assay is based on a double-antibody 'sandwich' technique. Each well of the microwell plate supplied with the kit has been coated with a monoclonal antibody specific for human CRP (mouse anti-human CRP). This antibody will bind any human CRP introduced into the well. Standards and samples are incubated on the antibody-coated plate, and the plate is then rinsed before addition of an HRP-labeled CRP monoclonal antibody to detect the captured CRP. The two antibodies form a 'sandwich' by binding to different locations on the CRP molecule. The concentration of the analyte is determined by measuring the enzymatic activity of HRP using the chromogenic substrate TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). After a sufficient period of time, the reaction is stopped with acid, forming a product with a distinct yellow color that can be measured at 450 nm. The intensity of this color, determined spectrophotometrically, is directly proportional to the amount of bound HRP-labeled monoclonal antibody, which in turn is proportional to the concentration of the CRP.

Absorbance \propto [Anti-CRP HRP] \propto [CRP]



6th Edition, revised in June, 2015

Assay procedure

Bring all reagents and samples to room temperature before use. Centrifuge the sample again after thawing before the assay. **All the reagents should be mixed thoroughly by gently swirling before pipetting. Avoid foaming.** It's recommended that all samples and standards be assayed in duplicate.

1. **Add Sample:** Add 100 μ L of Standard, Blank, or Sample per well. The blank well is added with Reference Standard & Sample diluent. Solutions are added to the bottom of micro ELISA plate well, avoid inside wall touching and foaming as possible. Mix it gently. Cover the plate with sealer we provided. Incubate for 90 minutes at 37°C.
2. **Biotinylated Detection Ab:** Remove the liquid of each well, don't wash. Immediately add 100 μ L of Biotinylated Detection Ab working solution to each well. Cover with the Plate sealer. Gently tap the plate to ensure thorough mixing. Incubate for 1 hour at 37°C.
3. **Wash:** Aspirate each well and wash, repeating the process three times. Wash by filling each well with Wash Buffer (approximately 350 μ L) (a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or automated washer are needed). Complete removal of liquid at each step is essential. After the last wash, remove remained Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and pat it against thick clean absorbent paper.
4. **HRP Conjugate:** Add 100 μ L of HRP Conjugate working solution to each well. Cover with the Plate sealer. Incubate for 30 minutes at 37°C.
5. **Wash:** Repeat the wash process for five times as conducted in step 3.
6. **Substrate:** Add 90 μ L of Substrate Solution to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate for about 15 minutes at 37°C. Protect the plate from light. The reaction time can be shortened or extended according to the actual color change, but not more than 30minutes. When apparent gradient appeared in standard wells, user should terminate the reaction.
7. **Stop:** Add 50 μ L of Stop Solution to each well. Then, the color turns to yellow immediately. The order to add stop solution should be the same as the substrate solution.
8. **OD Measurement:** Determine the optical density (OD value) of each well at once, using a micro-plate reader set to 450 nm. User should open the micro-plate reader in advance, preheat the instrument, and set the testing parameters.
9. After experiment, put all the unused reagents back into the refrigerator according to the specified storage temperature respectively until their expiry.

Important Note:

1. **ELISA Plate:** The just opened ELISA Plate may appear water-like substance, which is normal and will not have any impact on the experimental results.
2. **Add Sample:** The interval of sample adding between the first well and the last well should not be too long, otherwise will cause different pre-incubation time, which will significantly affect the experiment's accuracy and repeatability. For each step in the procedure, total dispensing time for

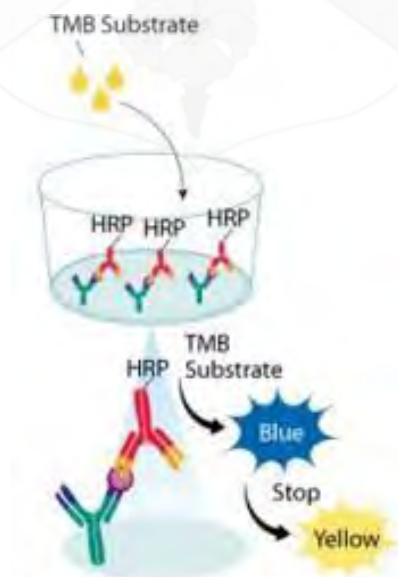
LAMPIRAN H

Kit Prosedur Bagi Penentuan *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α)

Principle

This immunometric assay is based on a double-antibody 'sandwich' technique. Each well of the micro well plate supplied with the kit has been coated with a monoclonal antibody specific for TNF- α (TNF- α capture antibody). This antibody will bind any TNF- α introduced into the well. An acetylcholinesterase:Fab' Conjugate (AChE:Fab'), which binds selectively to a different epitope on the TNF- α molecule, is also added to the well. When TNF- α (standard or sample) is added to the well, the two antibodies form a 'sandwich' by binding on opposite sides of the TNF- α molecule. The 'sandwiches' are immobilized on the plate so the excess reagents may be washed away. The concentration of the analyte is then determined by measuring the enzymatic activity of the AChE by adding Ellman's Reagent (which contains the substrate for AChE) to each well. The product of the AChE-catalyzed reaction has a distinct yellow color which absorbs strongly at 412 nm. The intensity of this color, determined spectrophotometrically, is directly proportional to the amount of bound Conjugate which in turn is proportional to the concentration of the TNF- α .

Absorbance \propto [AChE:Fab' Conjugate] \propto [TNF- α]



6th Edition, revised in June, 2015

Assay procedure

Bring all reagents and samples to room temperature before use. Centrifuge the sample again after thawing before the assay. **All the reagents should be mixed thoroughly by gently swirling before pipetting. Avoid foaming.** It's recommended that all samples and standards be assayed in duplicate.

1. **Add Sample:** Add 100 μ L of Standard, Blank, or Sample per well. The blank well is added with Reference Standard & Sample diluent. Solutions are added to the bottom of micro ELISA plate well, avoid inside wall touching and foaming as possible. Mix it gently. Cover the plate with sealer we provided. Incubate for 90 minutes at 37°C.
2. **Biotinylated Detection Ab:** Remove the liquid of each well, don't wash. Immediately add 100 μ L of Biotinylated Detection Ab working solution to each well. Cover with the Plate sealer. Gently tap the plate to ensure thorough mixing. Incubate for 1 hour at 37°C.
3. **Wash:** Aspirate each well and wash, repeating the process three times. Wash by filling each well with Wash Buffer (approximately 350 μ L) (a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or automated washer are needed). Complete removal of liquid at each step is essential. After the last wash, remove remained Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and pat it against thick clean absorbent paper.
4. **HRP Conjugate:** Add 100 μ L of HRP Conjugate working solution to each well. Cover with the Plate sealer. Incubate for 30 minutes at 37°C.
5. **Wash:** Repeat the wash process for five times as conducted in step 3.
6. **Substrate:** Add 90 μ L of Substrate Solution to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate for about 15 minutes at 37°C. Protect the plate from light. The reaction time can be shortened or extended according to the actual color change, but not more than 30minutes. When apparent gradient appeared in standard wells, user should terminate the reaction.
7. **Stop:** Add 50 μ L of Stop Solution to each well. Then, the color turns to yellow immediately. The order to add stop solution should be the same as the substrate solution.
8. **OD Measurement:** Determine the optical density (OD value) of each well at once, using a micro-plate reader set to 450 nm. User should open the micro-plate reader in advance, preheat the instrument, and set the testing parameters.
9. After experiment, put all the unused reagents back into the refrigerator according to the specified storage temperature respectively until their expiry.

Important Note:

1. **ELISA Plate:** The just opened ELISA Plate may appear water-like substance, which is normal and will not have any impact on the experimental results.
2. **Add Sample:** The interval of sample adding between the first well and the last well should not be too long, otherwise will cause different pre-incubation time, which will significantly affect the experiment's accuracy and repeatability. For each step in the procedure, total dispensing time for

LAMPIRAN I

Kit Prosedur Bagi Penentuan *Troponin* (cTn)

Principle

Immobilization Antibody



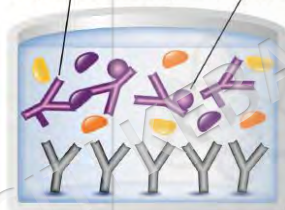
Remove appropriate number of antibody coated well strips. Equilibrate all reagents to room temperature. Prepare all reagents, samples, and standards as instructed.

Matrix Proteins Target Analyte



Add standard or sample to appropriate wells.

Capture Antibody Detector Antibody



Add Antibody Cocktail to all wells. Incubate at room temperature.

Substrate Color Development



Aspirate and wash each well. Add TMB Substrate to each well and incubate. Add Stop Solution at a defined endpoint. Alternatively, record color development kinetically after TMB substrate addition.

Cardiac Troponin I *in vitro* Simple Step ELISA® (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit is designed for the quantitative measurement of Cardiac Troponin I human protein in serum, plasma, cell culture supernatants, tissue and cell extracts. The Simple Step ELISA® employs an affinity tag labeled capture antibody and a reporter conjugated detector antibody which immunocapture the sample analyte in solution. This entire complex (capture antibody/analyte/detector antibody) is in turn immobilized via immunoaffinity of an anti-tag antibody coating the well. To perform the assay, samples or

standards are added to the wells, followed by the antibody mix. After incubation, the wells are washed to remove unbound material. TMB substrate is added and during incubation is catalyzed by HRP, generating blue coloration. This reaction is then stopped by addition of Stop Solution completing any color change from blue to yellow. Signal is generated proportionally to the amount of bound analyte and the intensity is measured at 450 nm. Optionally, instead of the endpoint reading, development of TMB can be recorded kinetically at 600 nm.



6th Edition, revised in June, 2015

Assay procedure

Bring all reagents and samples to room temperature before use. Centrifuge the sample again after thawing before the assay. **All the reagents should be mixed thoroughly by gently swirling before pipetting. Avoid foaming.** It's recommended that all samples and standards be assayed in duplicate.

1. **Add Sample:** Add 100 μ L of Standard, Blank, or Sample per well. The blank well is added with Reference Standard & Sample diluent. Solutions are added to the bottom of micro ELISA plate well, avoid inside wall touching and foaming as possible. Mix it gently. Cover the plate with sealer we provided. Incubate for 90 minutes at 37°C.
2. **Biotinylated Detection Ab:** Remove the liquid of each well, don't wash. Immediately add 100 μ L of Biotinylated Detection Ab working solution to each well. Cover with the Plate sealer. Gently tap the plate to ensure thorough mixing. Incubate for 1 hour at 37°C.
3. **Wash:** Aspirate each well and wash, repeating the process three times. Wash by filling each well with Wash Buffer (approximately 350 μ L) (a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or automated washer are needed). Complete removal of liquid at each step is essential. After the last wash, remove remained Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and pat it against thick clean absorbent paper.
4. **IIRP Conjugate:** Add 100 μ L of IIRP Conjugate working solution to each well. Cover with the Plate sealer. Incubate for 30 minutes at 37°C.
5. **Wash:** Repeat the wash process for five times as conducted in step 3.
6. **Substrate:** Add 90 μ L of Substrate Solution to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate for about 15 minutes at 37°C. Protect the plate from light. The reaction time can be shortened or extended according to the actual color change, but not more than 30minutes. When apparent gradient appeared in standard wells, user should terminate the reaction.
7. **Stop:** Add 50 μ L of Stop Solution to each well. Then, the color turns to yellow immediately. The order to add stop solution should be the same as the substrate solution.
8. **OD Measurement:** Determine the optical density (OD value) of each well at once, using a micro-plate reader set to 450 nm. User should open the micro-plate reader in advance, preheat the instrument, and set the testing parameters.
9. After experiment, put all the unused reagents back into the refrigerator according to the specified storage temperature respectively until their expiry.

Important Note:

1. **ELISA Plate:** The just opened ELISA Plate may appear water-like substance, which is normal and will not have any impact on the experimental results.
2. **Add Sample:** The interval of sample adding between the first well and the last well should not be too long, otherwise will cause different pre-incubation time, which will significantly affect the experiment's accuracy and repeatability. For each step in the procedure, total dispensing time for

LAMPIRAN J

Kit Prosedur Bagi Penentuan *Lactate dehydrogenase (LDH)*

BioVision

rev. 03/15

For research use only

Lactate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit

(Catalog#K726-500, 500 assays; Store kit at -20°C)

I. Introduction:

Lactate dehydrogenase (LDH) is an oxidoreductase (EC 1.1.1.27) present in a wide variety of organisms. LDH catalyzes the interconversion of pyruvate and lactate, with the concomitant interconversion of NADH and NAD⁺. When disease or injury damages tissue, cells release LDH into the bloodstream. Being a fairly stable enzyme, LDH activity is widely used to quantify damage. Quantification of LDH thus has a broad range of applications. In this colorimetric assay, LDH reduces NAD to NADH, which then interacts with a probe to produce a color (λ_{max} = 450 nm). The kit quantifies LDH activity in variety of biological samples such as serum or plasma, cells, culture media and fermentation, etc. The assay is quick, convenient and sensitive. The kit can detect 1 - 100 mU/ml of LDH directly in samples.

II. Kit Contents:

Components	K726-500	Cap. Code	Part Number
LDH Assay Buffer	50 ml	NM	K726-500-1
LDH Substrate Mix (lyophilized)	1 vial	Amber	K726-500-2
NADH Standard (0.5 μ mol; lyophilized)	1 vial	Yellow	K726-500-3
LDH Positive Control (lyophilized)	1 vial	Red	K726-500-4

III. Storage and Handling:

Store kit at -20°C, protect from light. Warm the Assay Buffer to room temperature before use. Centrifuge all vials briefly prior to opening. All solutions are stable for at least: 1 week at 4°C and 1 month at -20°C. Read the entire protocol before the assay.

IV. Reagent Reconstitution and General Consideration:

Substrate Mix: Dissolve with 1:1 in dH₂O for 10 min, sufficient for 500 reactions.

NADH Standard Solution: Dissolve NADH standard into 0.4 ml dH₂O to generate 1.25 mM NADH Standard Solution.

LDH Positive Control: Reconstitute LDH with 200 μ l LDH Assay Buffer. Add 2 - 5 μ l reconstituted LDH as Positive Control. Keep on ice when using.

1. Sample Preparations:

Homogenize 0.1 g Tissues, or 10⁷ Cells, or 0.2 ml Erythrocytes on ice in 0.5 ml cold Assay Buffer. Centrifuge at 10,000 x g for 15 min at 4°C. Collect the supernatant for assay and store on ice. Serum can be tested directly. Add 2 - 50 μ l samples into a 96-well plate; bring the volume to 50 μ l with Assay Buffer. We suggest testing several cases of your sample to make sure the readings are within the standard curve range.

2. NADH Standard Curve:

Add 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ l of the 1.25 mM NADH Standard into 96-well plate in duplicate to generate 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 nmol/well standard. Bring the final volume to 50 μ l with Assay Buffer.

3. Reaction Mix: Mix enough reagents for the number of assays and standards to be performed. For each well, prepare a total 50 μ l Reaction Mix:

45 μ l Assay Buffer
5 μ l Substrate Mix Solution

Mix well. Add 50 μ l of the Reaction Mix to all samples, Positive Control, and Standard, mix well.

4. Measure OD 450 nm at T₁ to read A₁, measure again at T₂ after incubating the reaction at 37°C for 30 min (or longer if the LDH activity is low) to read A₂, protect from light. $\Delta A_{450nm} = A_2 - A_1$.

Note: (A) It is essential to read A₁ and A₂ in the reaction linear range. It is more accurate if you observe the reaction progress, then choose A₁ and A₂ in the linear portion. (B) For Standard Curve, use A₂ reading after 30 min incubation, do not subtract the A₁ reading. The Standard reading is stable for a few hours.

5. Calculation:

Subtract 0 nmol/well NADH background from all readings, plot NADH Standard Curve. Apply the sample ΔA_{450nm} to the NADH standard curve to get B (the NADH amount that was generated between T₁ and T₂).

$$\text{LDH Activity} = \frac{B}{(T_2 - T_1) \times V} \times \text{Sample dilution} = \text{nmol/min/ml} = \text{mU/ml}$$

Where: B is the NADH amount that was generated between T₁ and T₂ (n nmol).

T₁ is the time of first reading (A1) (n min).

T₂ is the time of second reading (A2) (n min).

V is the pretreated sample volume added into the reaction well (n ml).

NADH molecular weight: 763.0 g/mol.

Unit definition: One unit of LDH is the amount of enzyme that generates 1.0 μ mol NADH per minute at 37°C in our buffer system.

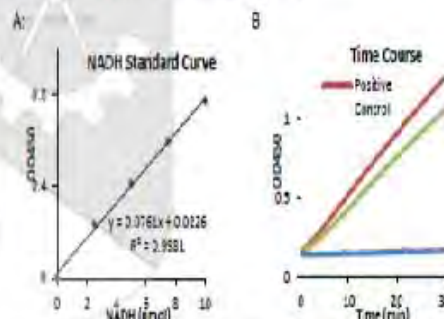


Figure: (A) NADH Standard curve. (B) Kinetic profiles of approx 0.5 mU of a sample of pure LDH (Positive control) and 2 μ l frozen human serum from a commercial source using buffer as a background control.

RELATED PRODUCTS:

Glutathione Reductase Assay Kit	Catalase Assay Kit
Colorimetric Glutathione Detection Kit	Glucose Assay Kit
Glutathione Kit (GSH, GSSG and Total)	GST Fluorometric Assay Kit
GST Colorimetric Assay Kit	Triglyceride Assay Kit
Acid Phosphatase Assay Kit	ADP/ATP Ratio Assay Kit
Phosphate Assay Kit	NAD/NADH Quantification Kit
Pyruvate Assay Kit	Lactate Assay Kit II
Ammonia Assay Kit	Glutamate Assay Kit

LAMPIRAN K

Kit Prosedur Bagi Penentuan *Free Fatty Acid* (FFA)

BioAssay Systems

Fatty Acid

EFA005.pdf

EnzyChrom™ Free Fatty Acid Assay Kit (EFA-100)

Quantitative Colorimetric/Fluorimetric Fatty Acid Determination

DESCRIPTION

Fatty acids are aliphatic monocarboxylic acids that are ubiquitously found in animal or vegetable fat, oil and wax. Fatty Acids play important roles in cellular synthesis, energy metabolism and are implicated in diverse disorders such as diabetes mellitus, sudden infant death syndrome and Reye Syndrome. BioAssay Systems' method provides a simple, one step and high throughput assay for measuring free fatty acids. In this assay, free fatty acids are enzymatically converted to acyl-CoA and subsequently to H_2O_2 . The resulting H_2O_2 reacts with a specific dye to form a pink colored product. The optical density at 670nm or fluorescence intensity (excitation: nm) is directly proportional to the free fatty acid concentration in the sample.

KEY FEATURES

Sensitive: Use 10 μ L samples. Linear detection range, colorimetric assay 7 - 1000 μ M, fluorimetric assay 7 - 100 μ M fatty acid.

Convenient: Room temperature "mix-and-read" procedure can be readily automated for high throughput assay of thousands of samples per day.

APPLICATIONS

Assays: free fatty acids in biological samples such as serum, plasma, urine, saliva, milk, cell cultures and in food, agriculture products.

Drug Discovery/Pharmacology: effects of drugs on free fatty acid metabolism.

KIT CONTENTS

Assay Buffer: 20 ml **Dye Reagent:** 120 μ L
Enzyme A: Dried **Enzyme B:** 200 μ L
CoSubstrate: 120 μ L **Standard:** 100 μ L, 100 μ M palmitic acid.

Storage conditions: The kit is shipped on ice. Store all components at -20°C. Shelf life of six months after receipt.

Precautions: reagents are for research use only. Normal precautions for laboratory reagents should be observed when using the reagents. Please refer to Material Safety Data Sheet for detailed information.

PROCEDURES**Reagent Preparation:**

Reconstitute Enzyme A by adding 120 μ L dH₂O to the Enzyme A tube. Make sure Enzyme A is fully dissolved by pipetting up and down and incubate at RT for 15 min. Store reconstituted Enzyme A at -20°C and use within 2 months.

Colorimetric Assay:

Liquid samples such as serum and plasma can be assayed directly. Milk and solid samples can be homogenized in 1% isopropanol and 1% Triton X-100 in water, followed by filtration through a 0.45 μ m PTFE syringe filter (e.g. VWR Cat# 20145-490).

Note: Salt containing reagents (e.g. β -mercaptoethanol, dithiothreitol, > 5 μ M), sodium azide, EDTA, and sodium diatrizoate sulfate are known to interfere in this assay and should be avoided in sample preparation.

1. Equilibrate all components to room temperature. Briefly centrifuge the tubes before opening. Keep thawed tubes on ice during assay. **Important:** the thawed standard solution should be clear and colorless. If the substrate is turbid, bring it to 37°C and gently swirl the tube (do not vortex) until the solution is clear.
2. Standards: Dilute standard in Assay Buffer as follows.

No	1000 μ M STD + Buffer	Vol (μ L)	Palmitic Acid (μ M)
1	100 μ L + 10 μ L	100	1000
2	60 μ L + 40 μ L	100	600
3	30 μ L + 70 μ L	100	300
4	0 μ L + 100 μ L	100	0

Transfer 10 μ L diluted standards into separate wells of a clear flat bottom 96-well plate.

Samples: transfer 10 μ L of each sample into separate wells of the plate.

3. **Color reaction:** Prepare enough Working Reagent by mixing, for each well, 90 μ L Assay Buffer, 1 μ L Enzyme A, 1 μ L Enzyme B, 1 μ L CoSubstrate and 1 μ L Dye Reagent. Add 80 μ L Working Reagent to each well. Tap plate to mix. Incubate 30 min at room temperature.

4. Read optical density at 670nm (550-565nm).

Fluorimetric Assay:

The fluorimetric assay procedure is similar to the colorimetric procedure except that (1) 0, 30, 60 and 100 μ M Standards and (2) a black 96-well plate are used. Read fluorescence intensity at λ_{ex} 580 nm and λ_{em} 585 nm.

Note: If the calculated free fatty acid concentration of a sample is higher than 1000 μ M in the Colorimetric Assay or 100 μ M in the Fluorimetric Assay, dilute sample in Assay Buffer and repeat the assay. Multiply result by the dilution factor *n*.

CALCULATION

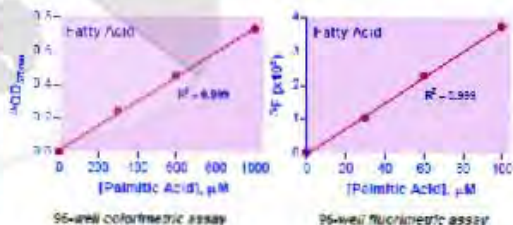
Subtract blank value (B4) from the standard values and plot the ΔOD or ΔF against standard concentrations. Determine the slope and calculate the fatty acid concentration of Sample.

$$[\text{Free Fatty Acid}] = \frac{R_{\text{Sample}} - R_{\text{Blank}}}{\text{Slope } (\mu\text{M})} \times n \quad (\mu\text{M})$$

R_{Sample} and R_{Blank} are optical density or fluorescence intensity readings of the Sample and Blank, respectively. *n* is the sample dilution factor.

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

Pipetting devices, centrifuge tubes, clear flat bottom uncoated 96 well plates (e.g. VWR cat# 82050-760), optical density plate reader, black flat-bottom uncoated 96-well plates (e.g. VWR cat# 82050-676), fluorescent plate reader. For milk and solid samples, 0.45 μ m PTFE syringe filter and 5% isopropanol, 5% Triton X-100 solution.

**PUBLICATIONS**

1. Hwang J et al (2012) Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes* 61(3):728-738.
2. Jelinek D et al (2012) The Niemann-Pick C1 gene is downregulated in livers of C57BL/6J mice by dietary fatty acids, but not dietary cholesterol, through feedback inhibition of the SIRT6 pathway. *J Nutr* 142(11):1935-1942.
3. Seo CW et al (2011) Antihypertensive and body fat lowering effects of silk proteins with different fibrinolytic compositions in mice fed with high fat diet. *J Agric Food Chem* 59(8):4152-4157.

LAMPIRAN L

Kit Prosedur Bagi Penentuan Triglyceride (TGL)

BioAssay Systems

Triglyceride

ETGA006.pdf

EnzyChrom™ Triglyceride Assay Kit (Cat# ETGA-200)

Quantitative Colorimetric Triglyceride Determination at 570nm

DESCRIPTION

TRIGLYCERIDE, also known as **TRIACYLTRIGLYCERIDE** or **TRIACYLGLYCERIDE**, is the main constituent in vegetable oil and animal fats. Triglycerides play an important role as energy sources and transporters of dietary fat. In the human body, high levels of triglycerides in the bloodstream have been linked to atherosclerosis, heart disease and pancreatitis. Simple, direct and automation-ready procedures for measuring triglyceride concentrations find wide applications in research and drug discovery. BioAssay Systems' triglyceride assay uses a single Working Reagent that combines triglyceride hydrolysis and glycerol determination in one step, in which a dye reagent is oxidized to form a colored product. The color intensity at 570nm is directly proportional to triglyceride concentration in the sample.

KEY FEATURES

Sensitive and accurate. Use as little as 10 µL samples. Linear detection range 0.01 mmol/L to 1.0 mmol/L (0.00 mg/dL to 99.5 mg/dL) triglyceride.

Simple and convenient. The procedure involves addition of a single working reagent and incubation for 30 min at room temperature, compatible for HTS assays.

Improved reagent stability. The optimized formulation has greatly enhanced the reagent and signal stability.

APPLICATIONS:

Direct Assays: triglyceride in biological samples (e.g. serum and plasma)

Drug Discovery/Pharmacology: effects of drugs on triglyceride metabolism.

KIT CONTENTS

Assay Buffer: 24 mL ATP: 250 µL Dye Reagent: 220 µL
Enzyme Mix: 500 µL Lipase: 1000 µL
Standard: 100 µL (equivalent to 100 nmol/L Triglyceride)

Storage conditions. The kit is shipped on ice. Store all components at -20°C. Shelf life of 12 months after receipt.

Precautions: reagents are for research use only. Normal precautions for laboratory reagents should be exercised while using the reagents. Please refer to Material Safety Data Sheet for detailed information.

PROCEDURES

Note: (1) SH group containing reagents (e.g. mercaptoethanol, 1011) may interfere with this assay and should be avoided in sample preparation. (2) If sample contains glycerol, use BioAssay Systems' EnzyChrom™ Glycerol Assay Kit (Cat# EGLY-200) to determine glycerol concentration and subtract the glycerol value to yield triglyceride concentration.

1. Equilibrate all components to room temperature. Keep thawed Lipase and Enzyme Mix in a refrigerator or on ice. Dilute Standard in distilled water as follows. Transfer 10 µL diluted standards into wells of a clear 96 well plate. Diluted standards can be used for future assays when stored refrigerated.

No	STD	H ₂ O	Vol (µL)	Triglyceride (nmol/L)
1	10µL	990µL	1000	1.0
2	6µL	994µL	1000	0.6
3	3µL	997µL	1000	0.3
4	0µL	1000µL	1000	0

Serum and plasma samples should be diluted 5-fold in dH₂O and are assayed directly. Cells and other solid samples can be solubilized in 5% Triton X 100. Transfer 10 µL samples into separate wells of the 96-well plate.

2. Prepare Working Reagent for each well, by mixing 100 µL Assay Buffer, 2 µL Enzyme Mix, 3 µL Lipase, 1 µL ATP and 1 µL Dye Reagent in a clean tube. Transfer 100 µL Working Reagent into standards and sample wells. Tap plate to mix.

3. Incubate 30 min at room temperature. Read optical density at 570nm (±40-48nm).

Note: If the Sample OD is higher than the Standard OD at 1.0 mmol/L triglyceride, dilute sample in water and repeat the assay. Multiply by the dilution factor *n*.

CALCULATION

Subtract OD_{water} (well #1) from the standard OD values and plot the OD against standard concentrations. Determine the slope using linear regression fitting. The triglyceride concentration of Sample is calculated as:

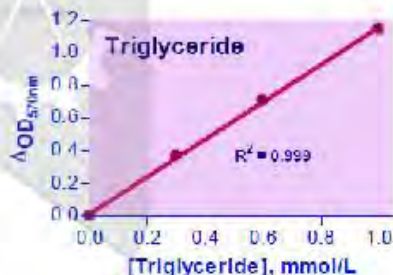
$$[\text{Triglyceride}] = \frac{\text{OD}_{\text{SAMPLE}} - \text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}}{\text{Slope}} \times n \quad (\text{mmol/L})$$

OD_{SAMPLE} and OD_{H₂O} are optical density values of the sample and the water blank (#1). *n* is the dilution factor. For example serum or plasma samples are diluted 5 fold prior to assay, *n* = 5.

Conversions: 1 mmol/L triglyceride equals 88.5 mg/dL or 10 ppm

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

Pipetting devices, centrifuge tubes, clear flat bottom 96-well plates (e.g. Corning Costar) and plate reader.



Standard Curve in 96 well plate assay

PUBLICATIONS

- Kim JIS et al (2010). Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. *Cell Metab.* 12(3):224-35
- Tam J et al (2010). Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest.* 120(8):2953-60
- Guo JJ et al (2011). Anthocyanin inhibits high glucose-induced hepatic mGPA11 activation and prevents fatty acid synthesis through PKC ζ . *J Lipid Res.* 52(5):906-22.

LAMPIRAN M

Jadual Pemprosesan Tisu Automatik

BIL	PERKARA	TEMPOH	MASA
1.	50% Alcohol	1 jam	4pm-5pm
2.	70% Alcohol	1 jam	5pm-6pm
3.	95% Alcohol	1.5 jam	6pm-7.30pm
4.	Absolute alcohol I	1 jam	7.30-8.30pm
5.	Absolute alcohol II	1.5 jam	8.30-10pm
6.	Absolute alcohol III	1.5 jam	10-11.30pm
7.	Equal part (Alcohol:Toulene)	1.5 jam	11.30-1am
8.	Toulene I	1 jam	1-2am
9.	Toulene II	1.5 jam	2-3.30am
10.	Toulene III	1.5 jam	3.30-5am
11.	Paraffin Wax I	2 jam	5am-7am
12.	Paraffin Wax II	2 jam	7am-9am

LAMPIRAN N

Penyediaan Larutan Pewarnaan Hematoksilin

Aluminium kalium sulfat [$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$] 50 g telah dilarutkan dalam 500 mL air suling. Kemudian larutan tersebut telah dipanaskan sehingga mendidih dengan menggunakan plat panas. Sebaliknya, 1.5 g hematoksilin telah ditimbang lalu dilarutkan dalam 25 mL larutan etanol 100%. Setelah itu, larutan hematoksilin dimasukkan ke dalam larutan aluminium kalium sulfat yang dipanaskan. Sekarang, campuran dua larutan itu dipanaskan sehingga mendidih. Selepas mendidih, proses pemanasan dihentikan dan 1.25 g merkuri (II) oksida (HgO) telah ditambahkan ke dalam larutan tadi dan dikacau sehingga larut. Kemudian, larutan yang terdiri daripada tiga campuran tersebut disejukkan sambil diletakkan di atas mesin pengacau magnetik supaya pengacauan diteruskan selama tiga jam. Setelah tiga jam, larutan pewarna itu dibiarkan di suhu 4°C selama semalaman. Pada hari esoknya, setiap 400 mL larutan pewarna telah ditambahkan dengan asid asetik sebanyak 1 mL lalu dikacau rata. Akhirnya, larutan tersebut telah dituras dengan kertas turas dan kemudiannya ia telah sedia digunakan bagi proses pewarnaan tisu. Adalah diingatkan bahawa, larutan pewarna hematoksilin yang digunakan telah disimpan pada suhu 4°C dan penurasan dilakukan apabila mendakan dikenalpasti dalam larutan tersebut.

LAMPIRAN O

Penyediaan Larutan Pewarnaan Eosin

Serbuk eosin sebanyak 4 g telah dimasukkan ke dalam 400 mL larutan etanol 95% lalu dilarutkan di atas mesin pengacau automatik. Selepas itu, 350 mL larutan tersebut telah dicampuran dengan 2 mL asid asetik lalu dikacau sehingga rata. Akhirnya, larutan pewarnaan itu telah dituraskan dengan kertas turas dan digunakan bagi proses pewarnaan. Adalah diingatkan bahawa, larutan pewarnaan eosin yang telah disediakan disimpan pada suhu 4°C dan penurasan telah dilakukan apabila terdapat mendakan diperhatikan dalam larutan tersebut.



LAMPIRAN P: Carta aliran pemprosesan tisu jantung

TEKNIK	LANGKAH	TEMPOH
	Tisu jantung ↓	
Penetapan:	Larutan formalin Berpenimbal fosfat 10% ↓	Dalam masa 24 hingga 48 jam
Penyahidratan:	Alkohol 50% Alkohol 70% Alkohol 95% Alkohol 100% I Alkohol 100% II Alkohol 100% III ↓	1 jam 1 jam 1 jam 30 minit 1 jam 1 jam 30 minit 1 jam 30 minit
Pencerahan:	Alkohol: Toulena (1:1) Toulena I Toulena II Toulena III ↓	1 jam 30min 1 jam 1 jam 30 minit 1 jam 30 minit
Infiltrasi & pembedaan :	Lilin Paraffin I Lilin Paraffin II ↓	2 jam 2 jam
Pembentukan blok:	Blok Paraffin ↓	
Penghirisan:	Hirisan 5µm ↓	
Penyediaan Slaid:	Hirisan disampaikan di atas permukaan air suling 50°C (mandian air) ↓	
	Hirisan dipancing menggunakan slaid ↓	Segera selepas pengambilan hirisan tisu
	Pengeringan slaid di atas plaat pemanasan (40°C)	Semalaman

LAMPIRAN Q: Carta aliran proses pewarnaan H&E

TEKNIK	LANGKAH	TEMPOH MASA
	Slaid tisu janung	
Penyahllilinan:	Xilena I	5 minit
	Xilena II	5 minit
Penghidratan:	Alkohol 100% I	3 minit
	Alkohol 100% II	3 minit
	Alkohol 95%	3 minit
	Alkohol 80%	3 minit
	Alkohol 70%	3minit
	Alkohol 50%	3 minit
	Air paip mengalir	1 minit
Pewarnaan Hematoksilin:	Pewarna Hematoksilin	10-15 minit
	Air paip mengalir	Cuci sehingga bersih
Pembezaan:	Larutan asid alcohol 1%	3 saat / 3 celupan
Pembiruaan:	Air paip mengalir	5-10 minit
	Pewarna Eosin	3-5 minit
Pewarnaan Eosin:		
Penyahidratan:	Alkohol 95% I	3 minit
	Alkohol 95% II	3 minit
	Alkohol 100% I	3 minit
	Alkohol 100% II	3 minit
Pembersihan:	Xilena I	5 minit
	Xilena II	5 minit
Proses pelekapan (mounting):	Larutan DPX	

LAMPIRAN R

Sijil Bengkel Epidemiologi Klinikal dan Methodologi Kajian



LAMPIRAN S

Sijil Bengkel Pengenalan dan Pengurusan Haiwan Makmal



LAMPIRAN T

Pembentangan Poster di *International Conference On Advance in Medical Sciences*

Effect of ADD-X on Blood Pressure and Body weight in Ovariectomized Sprague-Dawley Rats

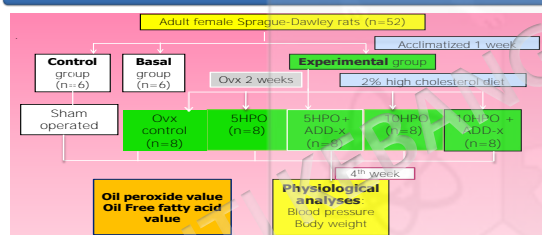
Kumeshini Sukalingam¹, Zar Chi Thent¹, Faizah Othman¹, Kamsiah Jaarin², Qodriyah MS², Suhaila Mohamed³

¹Department of Anatomy, ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz, Kuala Lumpur, Malaysia. ³Faculty of Food Science and Technology, Universiti Putra Malaysia, 43400 Serdang, Malaysia

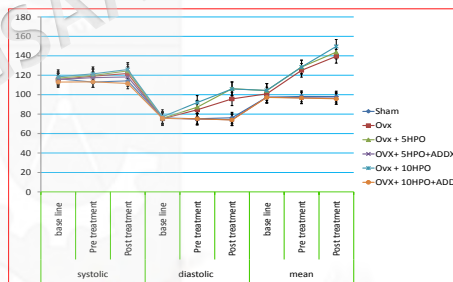
INTRODUCTION

Deep frying is the most common and one of the oldest methods of food preparation worldwide. It involves heat and mass transfer. To reduce the expenses, the oils tend to be used repeatedly for frying. When heated repeatedly, the oil undergoes various physical reactions such as foam formation, increases in viscosity, colour darkening and flavour deterioration which may affect the organoleptic quality such as odour, taste and nutritional value of the fried food (Oziwicz et al., 2005; Rani et al., 2010), which may alter the fatty acid composition of the oil. Heating causes the oil to undergo a series of chemical reactions like oxidation, hydrolysis and polymerization, which alter the chemical structure of triacylglycerol molecule with polyunsaturated fatty acids (PUFA) mostly affected (Gupta, 2005). During this process, many oxidative products such as hydroperoxide and aldehydes are produced, which can be absorbed into the fried food (Choe and Min, 2006). Therefore, when the degree of unsaturation in fatty acid is greater, it is more vulnerable to lipid peroxidation (Choe and Min, 2007). Obtaining the peroxide value of oil would provide us the value of its oxidation and perhaps to educate us on the safety of the concerned edible oil. Palm oil is obtained from mesocarp *Elaeis guineensis*, and the most commonly used vegetable oils in the household and industry in Malaysia for deep frying purposes. Due to the rising demand and increase in fat intake, palm oil is major oil in the world, oils and fats trade with its usage to be continued through year 2016 as the most influential fat source (Gunstone, 2002). Palm oil is rich in tocopherols and tocotrienols, possess better antioxidant activity (Kamsiah et al., 2005). The palm oil has monounsaturated (50%) and saturated fatty acids (50%) ratio close to one and naturally very stable due to its chemical properties (Edem, 2002). Chronic consumption of repeatedly heated vegetable oils could be detrimental to health. It was shown to demonstrate genotoxic and preneoplastic change in the rat liver (Srivastava et al., 2010). It also impaired fluid and glucose intestinal absorption in rats (Obembe et al., 2011). These accumulating data suggest chronic intake of heated cooking oils increases the risk of cancer and cardiovascular diseases. The practice of reusing frying oil imposes harmful effects on health such as an increased risk of hypertension (Leong et al., 2009); disturbance of endothelial function (Leong et al., 2010) and histological abnormalities (Leong et al., 2008). Free radicals generated during frying process could damage lipids to initiate lipid peroxidation. The incidence of cardiovascular disease is higher in men compared to women of similar age (Rossouw, 2002). However, after menopause, the risk increases in women due to deficiency of estrogen level. The estrogen was shown to be cardioprotective in ovariectomized female rats (Lu et al., 2012). Ovariectomized female rats have been used widely as a postmenopausal model (Shuid et al., 2011; Mvondo et al., 2011). Additive X (ADD-X) a plant extract belongs to the Rutaceae plant family is known to possess beneficial effects in health. The present study was aimed to determine the effects of heated palm oil mixed with ADD-X on the blood pressure and body weight changes in ovariectomized rats fed with cholesterol diet.

METHODS



Blood Pressure



RESULTS

Fatty acid composition and peroxide values of fresh and heated palm oil with ADD-X

Fatty acids	FPO	FPO + ADDX	1HPO	1HPO + ADDX	5HPO	5HPO + ADDX	10HPO	10HPO + ADDX
SFA (%)	42.87	42.92	42.64	42.80	43.25	42.97	43.28	43.10
MUFA (%)	48.94	48.98	49.24	49.70	48.21	48.21	49.64	48.78
PUFA (%)	8.18	8.20	8.52	8.31	7.97	8.21	6.08	8.15*
Peroxide values (mEq O ₂ /kg) #	2.22 ± 0.25	2.20 ± 0.25	6.41 ± 0.15 ^b	3.48 ± 0.12 ^{a,c}	9.18 ± 0.06 ^b	4.56 ± 0.15 ^{a,c}	11.76 ± 0.23 ^b	6.89 ± 0.25 ^{a,c}

FPO, fresh palm oil; 1HPO, palm oil heated once; 5HPO, palm oil heated five times; 10HPO, palm oil heated ten times; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids. Statistic: Analysis of variance (ANOVA); indicates significant difference between groups (# indicates values are average of three estimations (means ± SEM). *p<0.05; FPO vs FPO + ADD-X; 1HPO vs 1HPO + ADDX; 5HPO vs 5HPO + ADDX; 10HPO vs 10HPO + ADDX; #p<0.05; FPO vs 1HPO; FPO vs 5HPO; FPO vs 10HPO; #p<0.05; FPO vs 1HPO + ADDX; FPO vs 5HPO + ADDX; FPO vs 10HPO + ADDX.

Statistic: Analysis of variance (ANOVA); indicates significant difference between groups (p<0.05). # indicates values are average of three estimations (means ± SEM). *p<0.05; Ovx control vs ADD-X treated group #p<0.05; repeated heated oil vs oil vs ADD-X treated group

Food intake and body weight gain in rats fed with respective palm oil diets with ADD-X

Groups	Food intake (g/weeks)			Body Weight (g)		
	Baseline	Pre treatment	Post treatment	Baseline	Pre treatment	Post treatment
Sham	172.5 ± 4.67	185.2 ± 8.34	236.9 ± 9.67 ^a	205.43 ± 19.13	221.36 ± 18.95	228.43 ± 15.23
Ovx	169.7 ± 3.13	229.5 ± 7.37 ^{a,b}	332.7 ± 9.17 ^{a,b}	208.43 ± 13.90	240.22 ± 15.30	288.43 ± 13.9 ^b
Ovx + 5HPO	136.4 ± 2.98 ^b	252.7 ± 5.87 ^{a,c}	325.4 ± 2.98 ^a	195.14 ± 14.84	240.64 ± 18.19 ^a	295.14 ± 14.84 ^a
Ovx + 5HPO + ADDX	155.9 ± 3.67	199.9 ± 7.15 ^{a,c}	294.9 ± 8.62 ^{a,c}	197.54 ± 17.85	224.89 ± 15.62 ^a	240.24 ± 11.65 ^a
Ovx + 10HPO	132.9 ± 2.51 ^c	255.6 ± 5.17 ^{a,c}	335.4 ± 7.28 ^a	199.71 ± 15.55	242.06 ± 11.32 ^a	317.34 ± 19.22 ^{a,c}
Ovx + 10HPO + ADDX	149.5 ± 4.96 ^a	209.5 ± 4.67 ^a	304.7 ± 4.35 ^{a,c}	201.54 ± 15.67	228.49 ± 10.68	248.19 ± 14.2 ^a

LAMPIRAN U

Sijil Penyertaan dan Pembentangan Poster ICAMS



LAMPIRAN V

Manuskrip Yang Telah Diterima Dan Diterbitkan Oleh *International Journal of Pharmacology*

 OPEN ACCESS

International Journal of Pharmacology

ISSN 1811-7775

DOI: 10.3923/ijp.2016.



Research Article

Consumption of ADD-X and Repeatedly Heated Palm Oil on the Blood Pressure and Oxidative Stress Markers in Ovariectomized Rats

¹Kumeshini Sukalingam, ²Kamsiah Jaarin, ³Qodriyah Haji Mohd Saad, ³Suhaila Mohamed and ¹Faizah Othman

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia

³Department of Food Science, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Malaysia

Abstract

Background and Objective: Oxidative stress is connected with the pathogenesis of cardiovascular diseases. A series of deep fat frying in dietary cooking oil produce more amount of reactive oxygen species. In this study, repeatedly heated palm oil and ADD-X were studied for its effect on the Blood Pressure (BP), lipid peroxidation and antioxidant parameters. **Methodology:** Thirty female Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups with 6 rats each. All groups of the animals were ovariectomized after anesthetized. Group 1 was fed 2% cholesterol chow (Chol-C), groups 2 and 4, respectively fed 2% cholesterol chow along with 5 and 10 times heated palm oil (5 HPO and 10 HPO). Groups 3 and 5 were respectively given 2% cholesterol chow with 5 HPO and 10 HPO along with ADD-X. Duration of the feeding was 5 months. Systolic, diastolic and mean BP were monitored 4 weeks intervals using a non-invasive method. At the end of the study, blood was collected for oxidative stress and antioxidant parameters. **Results:** The BP was elevated significantly ($p < 0.05$) in 10 HPO and 5 HPO groups, respectively, where the 10 HPO group viewing higher values. The increased in BP was significantly lower in ADD-X treated groups. The level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was significantly increased in 5 HPO and 10 HPO treated animals and decrease antioxidant parameters compared to Chol-C animals. Consumption of ADD-X reduces TBARS and increase antioxidant enzymes. **Conclusion:** Repeatedly heated palm oil increases BP, lipid peroxidation and decrease antioxidant enzymes. Supplementation of ADD-X reversed the BP and reduce oxidative stress biomarkers in the post menopausal rat models.

Key words: ADD-X, heated palm oil, blood pressure, oxidative stress, antioxidant level

Received:

Accepted:

Published:

Citation: Kumeshini Sukalingam, Kamsiah Jaarin, Qodriyah Haji Mohd Saad, Suhaila Mohamed and Faizah Othman, 2016. Consumption of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the blood pressure and oxidative stress markers in ovariectomized rats. *Int. J. Pharmacol.*, CC BY CC.

Corresponding Author: Faizah Othman, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia

Copyright: © 2016 Kumeshini Sukalingam *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing Interest: The authors have declared that no competing interest exists.

Data Availability: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

INTRODUCTION

In this quick paced society, frying remains as one of the well liked methods in food preparation. Utilization of ready-made deep-fried food is high, especially in developing countries. Highly oxidized fatty acids are consumed through intake of these fried foods. Edible vegetable oil is the chief element in these fried food stuffs. Therefore, the cost of the oil becomes the most important factor to be considered in terms of economy. As a result, vegetable oils often to be repeatedly heated to ensure cost effectiveness. The oil is thus reused until it is discarded and replaced with fresh oil¹².

Palm oil is the chief oil among the globally produced oil and other fat market, which is proposed to remain the prominent fat source³ through 2016. It suggests superior resistance to high temperature oxidation during frying as well as usual antioxidants from the Vitamin E cluster, the tocotrienols⁴. Hence, the usage of oil is repeatedly used to reduce the expenditure of food preparation. When frying oil is heated at high temperatures, the oil undergoes various changes of organoleptic properties, nutritional alterations along with the formation of hydroperoxides and aldehydes⁵. These noxious stuffs are engrossed with the food and ultimately enters into the body and may have a detrimental effect on health⁶.

Studies have shown that the consumption of repeatedly heated palm and soybean oils drastically increased the blood pressure in experimental animals^{7,8}. Moreover, Leong et al⁹ also reported that consumption of repeatedly heated frying oils is linked with increased prevalence of hypertension. The usage of reheated frying oil gives rise to unfavourable health risks such as atherosclerosis¹⁰, disturbance of endothelial function and alterations in genetic materials¹¹. Many study data recommended that chronic consumption of reheated cooking oil enhances the risk of CVD and cancer⁶. The occurrence of CVD is higher in men relatively to women of the same age group¹¹. However, after menopause, the risk increases in women due to deficiency of estrogen level. The caution was shown to be cardioprotective in ovariectomized female rats¹².

The generation of reactive oxygen species during the reheated frying process may possibly injure membrane lipids through lipid peroxidation. Malondialdehyde (MDA), one of the end products of secondary oxidation of poly unsaturated fatty acids has been revealed to be of biochemical implications¹³, which causes endothelial damage, vascular inflammation and cell membrane injury¹⁴. Oxidative degradation of heated palm oil was proven to produce higher peroxide values^{15,16} and increased in plasma MDA levels¹⁷. Many of the antioxidants and lives available in the

real market are made up of synthetic chemicals, which help to scavenge these free radicals. Plants possess abundant biophenolic compounds, which are antioxidant agents based on their redox properties or that permitted them to act as reducing agents.

The ADD-X is a crude extracts obtain from the plant parts of the Rutaceae family to be incorporated into a cooking oil for reducing oil adsorption into fried food composition¹⁸. The additive stuffs proved to emuloy as a natural fat antioxidant, inhibitor of oil absorption due to the presence of health promoting composition that makes the fried food less dangerous to health. The present study aimed to determine the effect of ADD-X and reheated palm oil on blood pressure and antioxidant biomarkers. In the best of our facts, this might be the initial study of its kind. The study further suggested that ADD-X is a stable antioxidant even though it has been treated at high temperature, may have no detrimental effect on BP and intertidal oxidative humantoxin synthesis. Therefore, it may be consumed as frying cooked oil in near future.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals: The ADD-X was acquired from Faculty of Medicine, Universiti Putra Malaysia (UPM), Malaysia. The SOD, CAT, TBARS and reduced GSH assay kits were purchased from the Cayman Chemical Company, USA. Two percent cholesterol diet was obtained from Nestle, Scintific Sdn Bhd, Singapore. All other chemicals were of analytical grade.

Animals: This study was performed after obtaining the ethical approval from the Universiti Kebangsaan Malaysia Animal Ethics Committees. Thirty adult female Sprague-Dawley rats (weighing 250-300 g) were used for the present study. All the rats had free access to drink water and feed on the cholesterol chow. The animals were allowed to acclimatize for 1 week before the experiment was performed. Throughout the study, the rats were housed one per cage, kept under controlled environmental conditions (12 h cycle light/dark) and provided free access to food and water *ad libitum*.

Experimental design: Animals were divided into 5 groups with 6 rats each. All groups of the animals were ovariectomized after anaesthetized of ketamine hydrochloride and xylazine at respective doses of 50 and 10 mg kg⁻¹ b.wt. i.p. of once before the ovariectomy protocol. Group 1 was fed 2% cholesterol chow (chol-C), while groups 2 and 4, respectively fed 2% cholesterol chow added along with 5 and 10 times heated palm oil (5 HPD and 10 HPD).

Groups 3 and 5 were respectively given 2% cholesterol chow added along with ADD-X and 5 and 10 times heated palm oil (5 HPOX and 10 HPOX). All groups of the rats were treated daily for 6 months. The BP was measured at baseline and at intervals of 4-24 weeks using a non-invasive method. After the treatment, the blood was drawn through the retro-orbital sinus superior to the treatment and at the end of the study. The blood was then centrifuged and obtains serum for the biochemical analysis.

Preparation of palm oil diet: Palm Oil (PO) used for this study was purchased from local manufacturer Organic Gain Sdn Bhd (Rangli, Selangor, Malaysia). It was used in 5 times heated or 10 times heated according to the earlier procedure explained by Owu *et al.*¹⁹ with little modifications. In brief, 2.5 L of palm oil was heated up to 180°C in a steel container and employed to deep-fry of 1.5 kg of sweet potatoes. The ADD-X extract with the proportion of 1:10 of ADD-X extract to palm oil were prepared. The heating process lasted for 15 min. The heated oil was then kept to chill at room temperature for 4 h. The same protocol was applied in the once heated palm oil group (1 HPO). Pre-cooled hot oil was again used to deep-fry one more new batch of 1 kg sweet potatoes. Frying process was continuously carried out without addition, any fresh oil to reimburse for oil losses. The similar heating method was repeated in that order of 4 and 9 times, 5 times heated palm oil (5 HPO) and 10 times heated palm oil (10 HPO) were obtained. The diets were prepared two times in a week. The ratio of cholesterol chow of the oil was 100:15. Then the mixture was dehydrated at 70°C in an oven for 4 h. The 1000 g of food will consist of 850 g of rat chow and 150 g of heated oil. The heated oil was consisting of 135 g of palm oil either fresh or repeatedly heated palm oil and 15 g of ADD-X extract.

Measurement of Peroxide Value (PV): The peroxide content of palm oil and ADD-X was measured using standard titration method (Official method Cd 8-53) as per the American Oil Chemists Society²⁰. Normally this technique needed 5 g of the oil that was mixed with 30 mL of acetic acid 20 mL of chloroform in a conical flask. Then, the solution was mixed with a gentle shaking followed by added 0.5 mL of saturated potassium iodide 30 mL of distilled water and a few drops of 10% starch solution. The sample was titrated against 0.01 N sodium thiosulphate solutions taken in the burette, which were previously standardized by using potassium dichromate and potassium iodide. The titration was persisting until the disappearance of blue colour. Peroxide values were then

defined by the divergence in volume of sodium thiosulphate solution used for oil samples and blank (without oil), divided by its normality. The rate of peroxidation in the oil sample was expressed as milliequivalents of active oxygen per kilogram.

Measurement of blood pressure: Blood pressure was measured using the non-invasive tail cuff method with sphygmomanometer technique using CODA data at the baseline and at the end of the experiment. The rats were anesthetized by inhalation of diethyl ether before the measurement was taken²¹. The readings were measured thrice one after the other and the mean was then taken as an ultimate reading for systolic BP²⁴. The experiment was continued for 24 weeks. The systolic, diastolic and mean blood pressure was determined monthly.

Biochemical parameters

Assay of catalase (CAT): The serum CAT level was estimated by the following method of Aebi²² with little modifications. The blood was mixed with 50 mM of phosphate buffer (pH 7.4) and kept at 4°C. Then, it was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. About 50 µL of supernatant was added to a cuvette that had 7 mL of 50 mM phosphate buffer. Added 1 mL of 30 mM hydrogen peroxide and changes in absorbance were measured for 30 sec at 240 nm at an interval of 15 sec. Catalase activity was assayed as units/mg protein.

Assay of superoxide dismutase (SOD): The serum SOD level was estimated by the following method of Kakkar *et al.*²³ with little modifications. The blood was mixed with 0.25 M tris sucrose buffer and kept at 4°C. Then, it was centrifuged at 10,000 × g rpm for 15 min. Supernatant was then fractionated by 50% ammonium sulphate and dialyzed overnight. An aliquot of the supernatant (100 µL) was added to sodium pyrophosphate buffer (pH 8.3) followed by the addition of 0.1 mL of 185 µM phenazine methosulphate, 0.3 mL of 300 mM nitroblue tetrazolium and 0.2 mL of 780 µM NADH. The reaction mixture was incubated for 90 sec at 30°C and stopped the reaction by adding 1 mL of glacial acetic acid. About 4 mL of n-butanol was then added and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The absorbance was measured at 560 nm. The SOD activity is expressed as units/mg protein as compared to the standard.

Assay of reduced glutathione (GSH): Serum reduced GSH level was estimated by the following method of Griffith²⁴ with little modifications. Centrifuged the blood at 200 rpm for

10 min at 4°C. Pipetted out the top yellow serum layer without disturbing the white buffy layer. Removed the white buffy layer (leukocytes) and discard. Lysed the erythrocytes in 4 times its volume of ice-cold water. Centrifuge at 10,000 rpm for 15 min at 4°C. Collected the supernatant and stored on ice. The serum was carried to be deproteinated before assay. Quantification of GSSG is accomplished by first derivatizing GSH with 2-vinylpyridine. Prepare a 1 M solution of 2-vinylpyridine in ethanol by mixing 108 μL of 2-vinylpyridine and 892 μL of ethanol. Add 10 μL of the 2-vinylpyridine solution per milliliter of sample from step 4 of deproteination of the sample. Mix well on a vortex mixer and incubate at room temperature for about 60 min and assay the sample. This procedure can derivatize up to 1 mM GSH. More concentrated samples should be diluted with MES Buffer before derivatization. Read the plate at 414 nm after 25 min. Reduced GSH activity is expressed as units/mg protein as compared to the standard.

Assay of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS):

Lipid peroxidation was measured in serum in form of MDA using thiobarbituric acid. The level of serum TBARS was estimated following a method of Ohkawa *et al.*²⁴. The blood was centrifuged using with 10% trichloroacetic acid at 4°C. About 0.2 mL homogenate was pipetted out into a clean test tube and added 0.3 mL of 8% sodium dodecyl sulphate and 2 mL of 30% acetic acid, 2 mL of 1% TBA and volume was made up to 6 mL using Double Distilled Water (DDW). The test tubes were then heated at 95°C for an hour in a boiling water bath. After cooling, added 1 mL of DDW and 5 mL of n-butanol: Pyridine (in the ratio of 15:1) mixture of the test tubes and it was centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The absorbance of developed colour was measured at 540 nm using photometry. Commercially available

tetraethoxypropane was used as a standard. The TBARS was assayed as nmol/mg protein.

Statistical analysis: The results for the BP, lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels were presented as percentages of the baseline values. All data analysis were conducted using SPSS version 22. The normality of the data was determined by Kolmogorov-Smirnov test. The peroxide values among the edible oil groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's honestly significant differences *post-hoc* test for differences between pairs of means when applicable. To analyze the differences in the BP activities and the levels of lipid peroxidation among the experimental groups, the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were performed. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. Data are expressed as Means \pm SD.

RESULTS

Peroxide values: The peroxide values measured in the oils are shown in Fig. 1. The values in the 1, 5 and 10 times heated palm and ADD-X were significantly elevated ($p < 0.005$) compared to the fresh oil, respectively. There was a significant increase ($p < 0.05$) in the peroxide index for 1 HPO (3-fold increase), 5 HPO (5-fold increase), 10 HPO (6-fold increase) compared with the value of fresh oil. Addition of ADD-X reduced peroxide values of 5 HPO and 10 HPO significantly ($p < 0.05$) compared to respective reheated palm oils groups.

Blood pressure: By the end of the study, there was an increase in systolic, diastolic and mean blood pressure in 5 HPO and 10 HPO compared to respective control. Rats fed 5 HPO or 10 HPO showed a significant decrease ($p < 0.05$) in systolic,

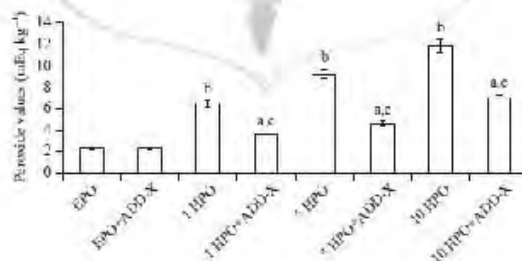


Fig. 1: Peroxide values (mEq kg⁻¹) in the fresh and heated palm and ADD-X. Bars represent Mean \pm SEM (n = 6). Horizontal line indicates a maximum allowable peroxide value for edible oils according to the American Oil Chemists Society²⁵, * $p < 0.005$ compared to 1 HPO, 5 HPO and 10 HPO, [†] $p < 0.05$ compared to FPO and [‡] $p < 0.05$ compared to FPO

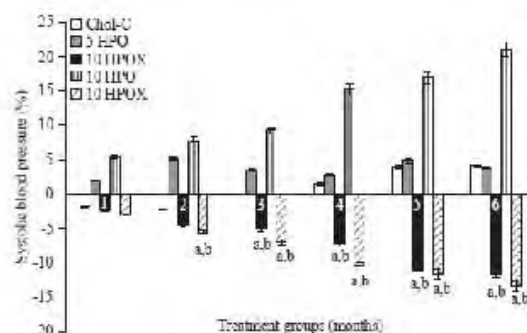


Fig. 2: Changes in the systolic BP level. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5 HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5 HPOX), palm oil heated 10 times (10 HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10 HPOX). The bars represent Mean and error bars, SD, with $n = 5$ in each group, $^*p < 0.05$: Chol-C vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively, $^{\#}p < 0.05$: 5 HPO and 10 HPO vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively

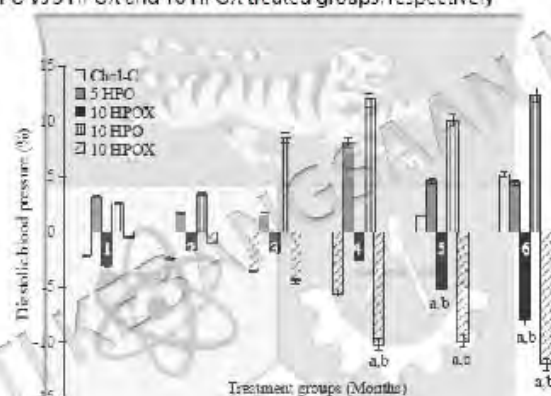


Fig. 3: Changes in the diastolic BP level. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5 HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5 HPOX), palm oil heated 10 times (10 HPO), ADD X with palm oil heated 10 times (10 HPOX). The bars represent Mean and error bars, SD, with $n = 5$ in each group, $^*p < 0.05$: Chol-C vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively, $^{\#}p < 0.05$: 5 HPO and 10 HPO vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively

diastolic and mean blood pressure compared to the 5 HPO and 10 HPO groups. Nevertheless, the results found that the rats fed with 10 HPOX showed significantly lower systolic, diastolic and mean blood pressure at the final month compared to all experimental groups (Fig. 2-4).

Changes in the SOD level: 5 HPO and 10 HPO groups reduced the CAT levels by 10 and 23%, respectively (Fig. 5). The ADD-X caused 18 and 20% elevation in SOD levels ($p < 0.05$) in 5 HPOX and 10 HPOX treated group, respectively compared to control.

Changes in the CAT level: The changes in the serum CAT level exhibited in Fig. 6. The 5 HPO and 10 HPO groups reduced the CAT levels by 9 and 26%, respectively. In contrast, ADD-X caused 25 and 28% increased in the activities of CAT levels ($p < 0.05$) for rats fed with 5 HPOX and 10 HPOX, respectively compared to normal control.

Changes in the reduced GSH level: The 5 HPO and 10 HPO groups reduced the GSH levels by 22 and 33%, respectively (Fig. 7). There were 28 and 32% enhanced activities of GSH levels ($p < 0.05$) for rats fed with 5 HPOX and 10 HPOX, respectively compared to control.

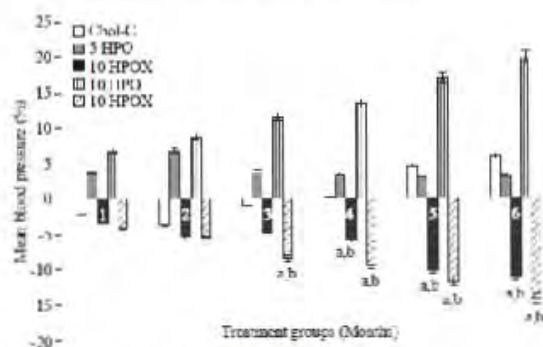


Fig. 4: Changes in the mean BP level. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5 HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5 HPOX), palm oil heated 10 times (10 HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10 HPOX). The bars represent Mean and error bars, SD, with $n=6$ in each group, $^*p<0.05$: Chol-C vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively, $^{\#}p<0.05$: 5 HPO and 10 HPO vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively.



Fig. 5: Percentage of change in the superoxide dismutase (SOD) level after 6 months of feeding with the cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5 HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5 HPOX), palm oil heated 10 times (10 HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10 HPOX). The bars represent Mean and error bars, SD, with $n=6$ in each group, $^*p<0.05$: Chol-C vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively, $^{\#}p<0.05$: 5 HPO and 10 HPO vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively.

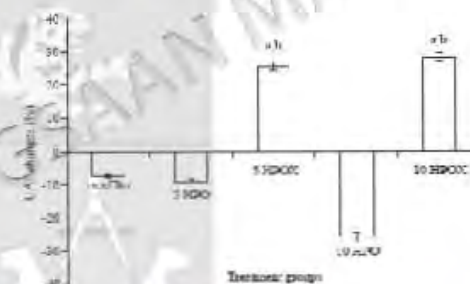


Fig. 6: Percentage of change in the catalase (CAT) level after 6 months of feeding with the cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5 HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5 HPOX), palm oil heated 10 times (10 HPO), ADD X with palm oil heated 10 times (10 HPOX). The bars represent Mean and error bars, SD, with $n=6$ in each group, $^*p<0.05$: Chol-C vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively, $^{\#}p<0.05$: 5 HPO and 10 HPO vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively.

DISCUSSION

In the present study, the peroxide values were increased by repeated heating of palm oil. This result may indicate repeated heating increased lipid peroxidation. The degree of oxidation was affected by the number of frying. Other than the peroxides, there are other oxidized components that are formed during oil heating, such as oxidative dimers and

Changes in the TBARS level: The changes in the serum TBARS level exhibited in Fig. 8. The 5 HPO and 10 HPO groups increased the TBARS levels by 2 and 30%, respectively. There were 21.7 and 19.2% decreased activities of TBARS levels ($p<0.05$) for rats fed with 5 HPOX and 10 HPOX, respectively compared to normal control rats.

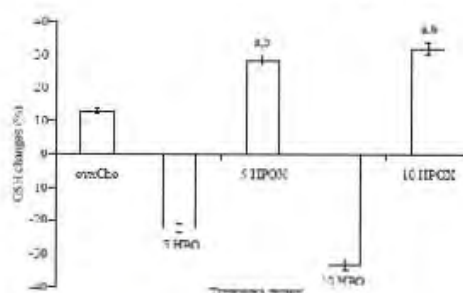


Fig.7: Percentage of change in the reduced glutathione (GSH) level after 6 months of feeding with the cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5 HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5 HPOX), palm oil heated 10 times (10 HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10 HPOX). The bars represent Mean and error bars, SD, with $n = 6$ in each group. ^a $p < 0.05$: Chol-C vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively, ^b $p < 0.05$: 5 HPO and 10 HPO vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively.

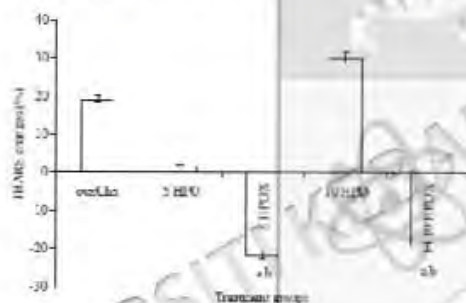


Fig.8: Percentage of changes in the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) level after 6 months of feeding with the cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5 HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5 HPOX), palm oil heated 10 times (10 HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10 HPOX). The bars represent Mean and error bars, SD, with $n = 6$ in each group. ^a $p < 0.05$: Chol-C vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively, ^b $p < 0.05$: 5 HPO and 10 HPO vs 5 HPOX and 10 HPOX treated groups, respectively.

oxidized triacylglycerols²⁵. The peroxide value of the 10 times heated oil in this study was 12 mEq kg⁻¹. This value was exceeding 10 mEq kg⁻¹ oil, which was the recommended the upper limit of peroxide value set by Rani *et al.*²⁶ the

American Oil Chemists' Society. This finding was in line with Awney *et al.*²⁷ who reported that the animals fed thermally oxidized soy oil had a peroxide value of 14 mEq kg⁻¹ in various organs such as liver, kidney, testes and brain. In this study heated 5 HPO and 10 HPO increase mean systolic and diastolic Blood Pressure (BP) of ovariectomized female rats. This finding was comparable to Jaarin *et al.*²⁸, Leong *et al.*²⁷ and Ng *et al.*¹⁶, who reported that heated palm and soy oil increase BP in normal male rats.

Ovariectomized female rats were used in this study as it mimic post menopause modal in women. Ovariectomy induced an estrogen deficit state. The estrogen has been shown to protect against oxidative stress²⁹. The increase in lipid peroxidation in the study was in part due to heated palm oil, which was further augmented by estrogen deficiency state. This finding was in agreement with Sanchez-Rodriguez *et al.*³⁰ who reported that menopause might be one of the major risk factors for oxidative stress. Supplementation of ADD-X to 5 HPO and 10 HPO significantly attenuated the blood pressure raising effect of heated palm oil.

This showed that heated 5 HPO and 10 HPO increased CAT, SOD and glutathione, which indicated oxidative stress, which was induced by heated oil and ovariectomy overwhelmed the body defense mechanism against oxidative stress. The ADD-X being rich in polyphenols were able to overcome the stress, oxidative condition leading to an increase in antioxidant enzymes defends mechanism. The protective effect of ADD-X in this study was due to its high contain of antioxidants such as polyphenols. The protective effect of antioxidant such as vitamin E on cardiovascular disease was already reported before³¹. Polyphenols have been reported to reduce blood pressure^{32,33}. This theory was further supported by significant reduction in antioxidant enzyme concentrations such as CAT, SOD and glutathione reductase in ADD-X supplemented groups compared to heated palm oil groups. This change happened together with blood pressure changes. Apart from heated oil the changes in TBARS, GSH, SOD and CAT levels may be due to estrogen-deficient state in rats. This finding was comparable to Vaishali *et al.*³⁴ and Ogunro *et al.*³⁵ who reported that estrogen deficiency reduced those antioxidant enzymes.

In the enzymatic antioxidant defense system, SOD is one of the most important enzymes and scavenges O₂⁻ anion (which is the first product of O₂ radicals) to form H₂O₂ and hence diminishes the toxic effects due to this radical or other free radicals derived from secondary reactions³⁶. The O₂⁻ anion is known to inactivate CAT³⁷.

Catalase has been regarded as a major determinant of hepatic and cardiac antioxidant status¹⁶. It is known to be involved in detoxification of H₂O₂ concentrations^{19,40}. These enzyme activities were inactivated by ROS during diabetes and cardiovascular diseases⁴¹. The GSH concentration in blood was significantly reduced, which is also indicative of oxidative stress. Increasing of GSH concentration in cardiac tissue in obese rats give response to free radical scavenger and protect cells against oxidative damage⁴².

CONCLUSION

Repeatedly heated palm oil caused oxidative stress and decrease antioxidant level in the blood and increases blood pressure. The treatment with ADD-X reduces the detrimental effect on blood pressure, which happened to a reduction in oxidative stress biomarkers and an increase in antioxidant enzymes. This finding may suggest that blood pressure lowering effect of ADD-X was mediated via its antioxidant property. Further pharmacological and biochemical investigations are under way to elucidate the mechanism of the blood pressure lowering effect of ADD-X.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by a grant from the KPM Ministry of Higher Education. There are no conflicts of interest regarding each of the authors involved in this research study.

REFERENCES

1. Leong, X.F., C.Y. Ng, K. Jaarin and M.R. Mustafa, 2010. Effects of repeated heating of cooking oils on antioxidant content and endothelial function. *Aust. J. Pharmacol. Therapeut.*, Vol. 3, No. 2.
2. Leong, X.F., M.N.M. Najib, S. Das, M.R. Mustafa and K. Jaarin, 2009. Intake of repeatedly heated palm oil causes elevation in blood pressure with impaired vasorelaxation in rats. *Tokoku J. Exp. Med.*, 219: 71-78.
3. Gunstone, F.D., 2002. Production and Trade of Vegetable Oils. In: *Vegetable Oils In Food Technology: Composition, Properties and Uses*, Gunstone, F.D. (Ed), Blackwell Publishing, Oxford, pp: 1-17.
4. Ong, A.S.H. and S.H. Coh, 2002. Palm oil: A healthful and cost-effective dietary component. *Food Nutr Bull.*, 23: 11-22.
5. Danowska-Oziewicz, M. and M. Karpińska-Tymoszczyk, 2005. Quality changes in selected frying fats during heating in a model system. *J. Food Lipids*, 12: 159-168.
6. Hamsi, M.A., O. Faizah, S. Das, Y. Kamisah and Z.C. Thent *et al.*, 2013. Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and inflammatory biomarkers: An experimental study in Sprague Dawley rats. *Alexandria J. Med.*, 51: 53-63.
7. Farooq, R.S., M.S. Abdel-Latif, A.M.M. Basuny and B.S. Abd El Hakeem, 2010. Effect of non-fried and fried oils of varied fatty acid composition on rat organs. *Agric. Biol. J. North Am.*, 1: 501-509.
8. Adam, S.K., S. Das and K. Jaarin, 2009. A detailed microscopic study of the changes in the aorta of experimental model of postmenopausal rats fed with repeatedly heated palm oil. *Int. J. Exp. Pathol.*, 90: 321-327.
9. Eshak, M.G., I.S. Ghaly, W.K.B. Khalil, I.M. Farag and K.Z. Ghanem, 2010. Genetic alterations induced by toxic effect of thermally oxidized oil and protective role of tomatoes and carrots in mice. *J. Am. Sci.*, 6: 175-188.
10. Khalil, W.K.B., H.A.M. Abd El-Kader, M.G. Eshak, I.M. Farag and K.Z. Ghanem, 2009. Biological studies on the protective role of artichoke and green pepper against potential toxic effect of thermally oxidized oil in mice. *Arab J. Biotechnol.*, 12: 27-40.
11. Mossouw, J.E., 2002. Hormones, genetic factors and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.*, 55: 550-557.
12. Liu, H., G.C. Melendez, S.P. Levick and J.S. Janicki, 2012. Prevention of adverse cardiac remodeling to volume overload in female rats is the result of an estrogen altered mast cell phenotype. *Am. J. Physiol-Heart Circ. Physiol.*, 302: H811-H817.
13. Adam, S.K., I.N. Soelaiman, N.S. Umar, N. Mokhtar, N. Mohamed and K. Jaarin, 2008. Effects of repeatedly heated palm oil on serum lipid profile, lipid peroxidation and homocysteine levels in a post-menopausal rat model. *McGill J. Med.*, 11: 145-151.
14. Azlina, A.A., H.S. Faridah, H.M.S. Qodriyah and M.F.N. Azlina, 2009. Effects of *Piper sarmentosum* water extract on 11- β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 bioactivity in ovariectomy-induced obese rats. *Int. J. Pharmacol.*, 5: 362-369.
15. Harrison, D.G., M.C. Gongora, T.J. Guzik and J. Widder, 2007. Oxidative stress and hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.*, 1: 30-44.
16. Ng, C.Y., Y. Kamisah, O. Faizah, Z. Jubri, H.M.S. Qodriyah and K. Jaarin, 2012. Involvement of inflammation and adverse vascular remodelling in the blood pressure raising effect of repeatedly heated palm oil in rats. *Int. J. Vasc. Med.*, 10.1120/2012/404025.
17. Leong, X.F., M.R. Mustafa, S. Das and K. Jaarin, 2010. Association of elevated blood pressure and impaired vasorelaxation in experimental sprague-dawley rats fed with heated vegetable oil. *Lipid Health Dis.*, Vol. 9, 10.1186/1476-281X-9-66.

18. Mohamed, S. and F.M. Nor, 2013. Cooking oil composition with additive to reduce oil absorption, United States Patent US8425969B2. <http://www.google.com/patents/US8425969>.
19. Owu, D.U., E.E. Osim and P.E. Ebong, 1998. Serum liver enzymes profile of Wistar rats following chronic consumption of fresh or oxidized palm oil diets. *Acta Tropica*, 69: 65-73.
20. AOCS., 2003. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4th Edn., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.
21. Aebi, H.C., 1974. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. (Ed.). Academic Press, New York, USA., pp: 673-677.
22. Kakkar, P., B. Das and P.N. Viswanathan, 1984. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 21: 130-132.
23. Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, 106: 207-212.
24. Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 351-358.
25. Subermaniam, K., O.J.M. Saad, S. Das and F. Othman, 2014. Virgin Coconut Oil (VCO) decreases the level of malondialdehyde (MDA) in the cardiac tissue of experimental Sprague-Dawley rats fed with heated palm oil. *J. Med. Bioeng.*, 3: 102-106.
26. Rani, A.K.S., S.Y. Reddy and R. Chelana, 2010. Quality changes in trans and trans free fats/oils and products during frying. *Fit. Food Res. Technol.*, 230: 803-811.
27. Awney, H.A., 2011. The effects of *Bifidobacteria* on the lipid profile and oxidative stress biomarkers of male rats fed thermally oxidized soybean oil. *Biomarkers*, 16: 445-452.
28. Jaarin, K., M.R. Mustafa and X.F. Leong, 2011. The effects of heated vegetable oils on blood pressure in rats. *Clinics*, 66: 2125-2132.
29. Abbas, A.M. and A.Z. Eskamoudy, 2011. Effects of 17 β -estradiol and antioxidant administration on oxidative stress and insulin resistance in ovariectomized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 89: 497-504.
30. Sanchez Rodriguez, M.A., M. Zacarias Flores, A. Arroyave-Rosales, F. Correa-Munoz and V.M. Mendoza-Nunez, 2012. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause*, 19: 361-367.
31. Ismail, N.M., N.A. Ghafar, K. Jaarin, J.H. Khine and G.M. Top, 2000. Vitamin E and factors affecting atherosclerosis in rabbits fed a cholesterol-rich diet. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 51: 79-94.
32. Li, S.H., P. Zhao, H.B. Jian, L.H. Chen and L.Q. Cui, 2015. Effect of grape polyphenols on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE*, Vol. 10, 10.1371/journal.pone.0137665.
33. Diebolt, M., B. Bucher and R. Andriantsitohaina, 2001. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve no vasodilatation and induce gene expression. *Hypertension*, 38: 159-165.
34. Vaishali, S., S. Singh, S. Neeima and S. Shaila, 2005. Status of antioxidant enzymes and trace metals in postmenopausal women. *J. Obstet. Gynecol. India*, 55: 64-66.
35. Ogunro, P.S., A.A. Bolarinde, O.O. Owa, A.A. Salawu and A.A. Oshodi, 2014. Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and postmenopausal phase of life. *Afr. J. Med. Med. Sci.*, 43: 49-57.
36. Bhattacharya, A., A. Chatterjee, S. Ghosal and S.K. Bhattacharya, 1999. Antioxidant activity of active tannoid principles of *Embilica officinalis* (Amla). *Indian J. Exp. Biol.*, 37: 676-680.
37. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 323: 1396-1397.
38. Wnhalah, S.A. and D.V. Godin, 1987. Alterations in free radical tissue defense mechanisms in Streptozocin induced diabetes in rat: Effects of insulin treatment. *Diabetes*, 36: 1014-1018.
39. Yoshikawa, T., Y. Naho, A. Kishi, T. Tomii and T. Kaneko *et al.*, 1993. Role of active oxygen, lipid peroxidation and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut*, 34: 732-737.
40. Manonmani, G., K. Anbarasi, K. Balakrishna, C. Veluchamy and C.S. Shyamala Devi, 2002. Effect of *Terminalia arjuna* on the antioxidant defense system in alloxan induced diabetes in rats. *Biomedicine*, 22: 52-61.
41. Ahmed, S., A. Rahman, A. Alam, M. Saleem, M. Athar and S. Sultana, 2000. Evaluation of the efficacy of *Lawsonia alba* in the alleviation of carbon tetrachloride-induced oxidative stress. *J. Ethnopharmacol.*, 69: 157-164.
42. Vincent, H.K., S.K. Powers, A.J. Dirks and P.J. Scarpace, 2001. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int. J. Obesity Relat. Metab. Disord.*, 25: 378-388.

LAMPIRAN W

Manuskrip yang telah Diterima dan Diterbitkan oleh *International Journal of Toxicology and Pharmacology Research*

Available online on www.ijtp.com

International Journal of Toxicological and Pharmacological Research 2016; 8(4): 223-231

ISSN: 0975-5160

Research Article

Effect of Rutacea Plant Extract (ADD-X) on Inflammatory Biomarkers, Cardiac LDL, Troponin T and Histological Changes in Ovariectomized Rats Fed with Heated Palm Oil

Kimleshmi Sukalingam¹, Kamariah Jaarin², Qodriyah Hazi Mohd Saad², Suhaila Mohamed³, Faizah Othman⁴

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia.

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia.

³Department of Food Science, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Malaysia.

Available Online: 16th August, 2016

ABSTRACT

Palm oil is chief vegetable oil usually consumed worldwide. The consumption of repeatedly heated palm oil produces detrimental effect that attributes to the development of cardiovascular diseases. This study was aimed to determine the effects of ADD-X and repeatedly heated palm oil mixed with 2% cholesterol diet on cardiac, inflammatory biomarkers and histological changes in ovariectomized rats. Based on the administration of food, animals were divided into 7 groups with 6 rats each. All groups of the animals were ovariectomized except sham after anesthetized. The study was conducted for 6 months. Group I- Sham control fed with Normal rat chow (Sham), Group II- fed with Normal rat chow [Ovx (a)]; Group III- fed with 2% cholesterol chow [Ovx (c)]; Group IV- fed with 2% cholesterol chow mixed with five times heated palm oil (5HPO); Group V- fed with 2% cholesterol chow mixed with five times heated palm oil and ADD-X extract (5HPO-X); Group VI- fed with 2% cholesterol chow mixed with ten times heated palm oil (10HPO); Group VII fed with 2% cholesterol chow mixed with ten times heated palm oil and ADD-X extract (10HPO-X). The rats were sacrificed at the end of the study; blood was collected for cardiac and inflammatory biomarkers. The cardiac tissues of all groups were obtained for biochemical parameters and processed for histopathological examinations. Five times (5HPO) and ten times heated (10HPO) palm oil caused a significant ($p < 0.05$) increase in the level of cardiac lactate dehydrogenase (LDH), troponin (Tnp), serum C-reactive protein (CRP), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), free fatty acids and triglycerides with increase in cardiac weight compared to control. The changes in the biochemical parameters and cardiac weight were significantly ($p < 0.05$) attenuated by ADD-X supplementation to the heated oil. The histological sections of the heart showed presence of cardiac necrosis in the 5HPO and 10HPO. These histological changes were reduced with ADD-X supplementation. The consumption of repeatedly heated palm oil increases LDL, troponin, CRP, TNF α , triglyceride, FFA, heart weight and cause cardiac necrosis in the post menopausal rat models. Those changes were attenuated by ADDX supplementation.

Keywords: ADD-X; Heated palm oil; cardiac and inflammatory markers; post menopausal rat models.

INTRODUCTION

Palm oil is the most extensively produced vegetable oil in the world. It can be thermally oxidized to augment its palatability, composition changes and deteriorative effect¹. Repeatedly heated palm oil undergoes a sequence of chemical reactions causing alteration the fatty acid composition. Ingestion of the thermally oxidized oil has been reported as concomitant cytotoxic by-products, which are detrimental to cells, tissues and organs². Chronic consumption of dietary fats and oils influence the lipid metabolism and ultimately enhance the possibilities of cardiovascular diseases (CVD). Studies reported that heated vegetable oils increased risk of CVD such as hypertension^{3,4} and atherosclerosis⁵. Study postulated that the thermal oxidation of heated oil together with destruction of vitamin E⁶ were the attributed factors for heated oil-induced of CVD. Thermal oxidation and antioxidant

deficiency generate free radicals that might cause vascular inflammation^{8,9} that predisposed to vascular dysfunction leading to both hypertension and atherosclerosis. ADD-X is a plant crude extracts prepared from the Rutaceae family rich in polyphenols. It has been proven to have antioxidants properties and prevent oil absorption into the food¹⁰ (Mohamed and Nor, 2013). The present study was undertaken to see if ADD-X supplementation could reduce inflammation and cardiac protective effect.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The ADD-X was obtained from Faculty of Medicine, University Putra Malaysia (UPM), Malaysia. Palm oil used for this study was purchased from local manufacturer Organic Guin Sdn Bhd (Bangi, Selangor, Malaysia). For the inflammatory and cardiac markers studies, the ELISA

⁴Author for Correspondence: faizahman@gmail.com

kits for Troponin, TNF- α and CRP were purchased from ELab Science, USA. LDH activity assay kit was purchased from BioVision, USA. The cardiac biochemical parameters kits such as TGL and FFA were purchased from BioAssay System, USA. Two percent cholesterol diet was obtained from Next Gene Scientific Sdn Bhd, Singapore. All other chemicals were of analytical grade.

Animals

This study was performed after obtaining the ethical approval from the Universiti Kebangsaan Malaysia Animal Ethics Committees. Thirty adult female Sprague-Dawley rats (weighing 250-300g) were used for the present study. All the rats had free access to drinking water and fed on the cholesterol chow. The animals were allowed to acclimatize for 1 week before the experiment was performed. Throughout the study, the rats were housed one per cage, kept under controlled environmental conditions (12-hour cycle- light / dark) and provided free access to food and water *ad libitum*.

Experimental design

Based on the administration of food, animals were divided into seven groups with six rats each. All groups were ovariectomized except sham after being anesthetized with ketamine hydrochloride and xylazine at respective doses of 50 and 10 mg/kg b.w.i.p once before the ovariectomy procedure. Duration of the feeding was 6 months.

Group I: Sham control fed with Normal rat chow (Sham).

Group II: fed with Normal rat chow [Ovx (n)]

Group III: fed with 2% cholesterol chow [Ovx (c)]

Group IV: fed with 2% cholesterol chow mixed with five times heated palm oil (5HPO)

Group V: fed with 2% cholesterol chow mixed with five times heated palm oil and ADD-X extract (5HPO-X)

Group VI: fed with 2% cholesterol chow mixed with ten times heated palm oil (10HPO)

Group VII fed with 2% cholesterol chow mixed with ten times heated palm oil and ADD-X extract (10HPO-X)

Collection of blood and cardiac tissues

At the end of the study, i.e. at 24th week following HPO and ADD-X extract treatment, the rats were sacrificed with overdose of diethyl ether. Each rat was placed in a clean, dry place before blood and heart were taken out. Blood was drawn in heparinized tubes, and the serum was separated by centrifugation. The cardiac tissues were quickly removed, washed in ice cold, isotonic saline and blotted individually on ash-free filter paper and cardiac tissue weights were measured. Half of the tissues were then homogenized in 0.1M Tris-HCl buffer, at pH 7.4. The homogenate was used for the estimations of cardiac lipid profile, cardiac biomarker and inflammatory markers.

Preparation of palm oil diet

Palm oil (PO) used for this study was purchased from local manufacturer Organic Gain Sdn Bhd (Bangi, Selangor, Malaysia). Palm oil was used in five times heated or ten times heated according to the earlier protocol explained by Owu et al.¹¹ with little modifications. Before the frying process, ADD-X extract was prepared with a proportion of 1:10 of ADD-X extract to palm oil and added to the palm oil. In brief, 2.5 L of palm oil was heated up to 180°C in a steel container and employed to deep-fry of 1.5kg of sweet

potatoes. The heating process lasted for 15 min. The heated oil was then kept to chill at room temperature for 4 hours. The same protocol was applied in the once heated palm oil group (1HPO). Pre-cooled hot oil was again used to deep-fry one more new batch of 1kg sweet potatoes. Frying process was continuously carried out without addition, any fresh oil to reimburse for oil losses. The similar heating method was repeated in that order of four and nine times, to make up the five times heated palm oil (5HPO) and ten times heated palm oil (10HPO) respectively. The diets were prepared twice a week. The ratio of cholesterol chow to the oil was 100:15. The mixture was then dried at 70°C in an oven for 4 hours. Each 1000g of food prepared would consist of 850g of rat chow and 150g of heated oil. The heated oil consisted of 135g of palm oil either fresh or repeatedly heated palm oil and 15g of ADD-X extract.

Biochemical parameters

Assay of LDH

Serum LDH level was determined using a commercially available ELISA kit by the method of Hanson et al.¹² with little modifications. The standards and samples were prepared following the manufacturer's instruction. The intensity of coloured product (NADH) was measured using Thermo Scientific micro plate reader (USA) at 450 nm. OD 450 nm was measured to read A1 and incubated at 37°C for 30 minutes. Following the incubation OD 450 nm was measured again to read A2. The standard curve was generated using the A2 reading after subtracting the blank reading. Values of NADH at A1 and A2 were calculated from the standard curve and the LDH activity calculation is as follows as specified in the manufacturer's instruction:

$$\text{LDH activity} = \frac{B}{(T2 - T1)} \times \text{Sample dilution}$$

$$= \frac{\frac{\text{nmol}}{\text{min}}}{\text{ml}} - \frac{\text{mU}}{\text{ml}}$$

B was the NADH amount that was generated between T1 and T2 (Value A2 - Value A1) in nmol.

T1 was the time of first reading (A1) in min.

T2 was the time of second reading (A2) in min.

V was the pre-treated sample volume added into the reaction well (in ml).

Unit definition: One unit LDH was the amount of enzyme that catalyzed the conversion of lactate to pyruvate to generate 1.0 μmol to NADH per minute at 37°C.

Assay of Troponin

Cardiac troponin level was determined using a commercially available ELISA kit by the method of Anran et al.¹³ with little modifications. An amount of 100 μL of Standard, Blank, or Sample was placed in a well. Solutions were then added to the bottom of the micro ELISA plate well. It was gently mixed. The plate was covered and incubated for 90 minutes at 37°C. The liquid was removed from each well, and immediately added to 100 μL of Biotinylated Detection Ab working solution to each well. The plate was gently tapped to ensure thorough mix and incubated for 1 hour at 37°C. Each well aspirated and washed by buffer, and the process was

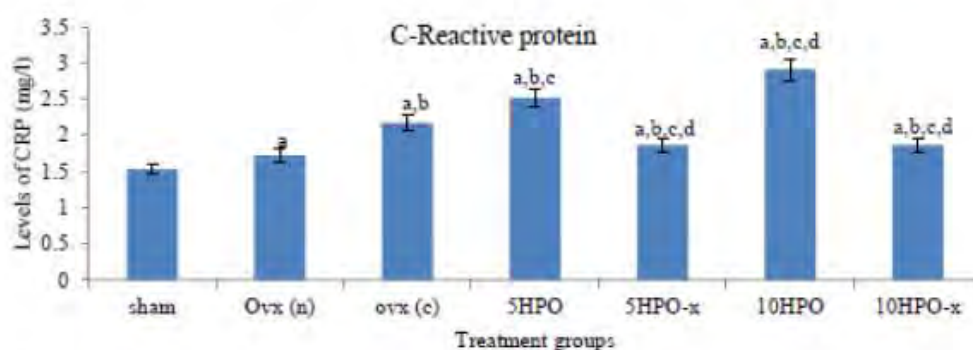


Figure 1: Effect of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the CRP level. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5HPOX), palm oil heated 10 times (10HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10HPOX). The bars represent mean, and error bars, SD, with $n = 6$ in each group. $p < 0.05$ indicates significant difference compared to ^asham, ^bOvX (n), ^cOvX (c), ^d5HPO and ^e5HPO-x groups respectively.

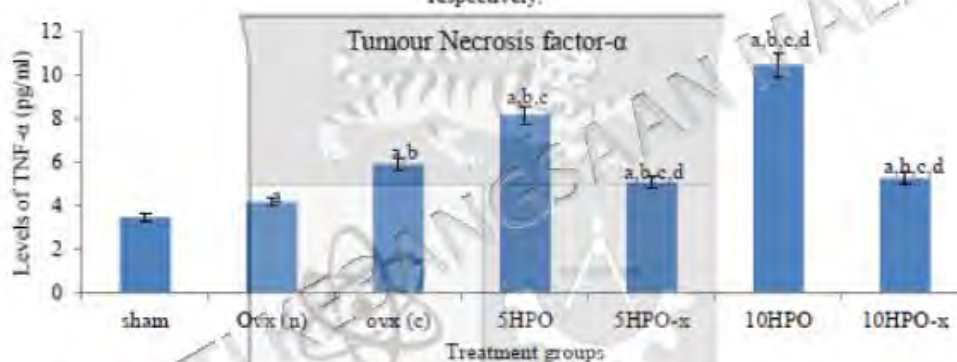


Figure 2: Effect of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the TNF-α levels. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5HPOX), palm oil heated 10 times (10HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10HPOX). The bars represent mean, and error bars, SD, with $n = 6$ in each group. $p < 0.05$ indicates significant difference compared to ^asham, ^bOvX (n), ^cOvX (c), ^d5HPO and ^e5HPO-x groups respectively.

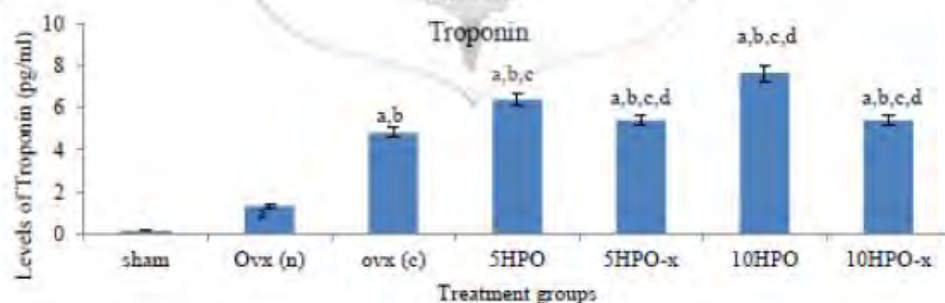


Figure 3: Effect of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the Troponin level. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5HPOX), palm oil heated 10 times (10HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10HPOX). The bars represent mean, and error bars, SD, with $n = 6$ in each group. $p < 0.05$ indicates significant difference compared to ^asham, ^bOvX (n), ^cOvX (c), ^d5HPO and ^e5HPO-x groups respectively.

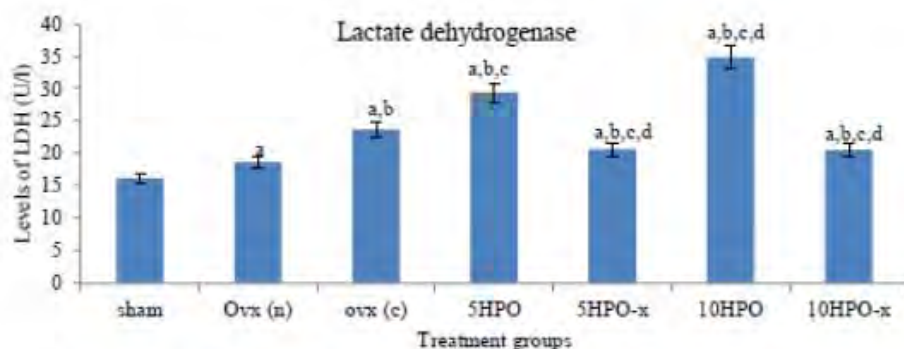


Figure 4: Effect of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the LDH level. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5HPOX), palm oil heated 10 times (10HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10HPOX). The bars represent mean, and error bars, SD, with $n = 6$ in each group. $p < 0.05$ indicates significant difference compared to ^asham, ^bOvX (n), ^cOvX (c), ^d5HPO and ^e5HPO-x groups respectively.

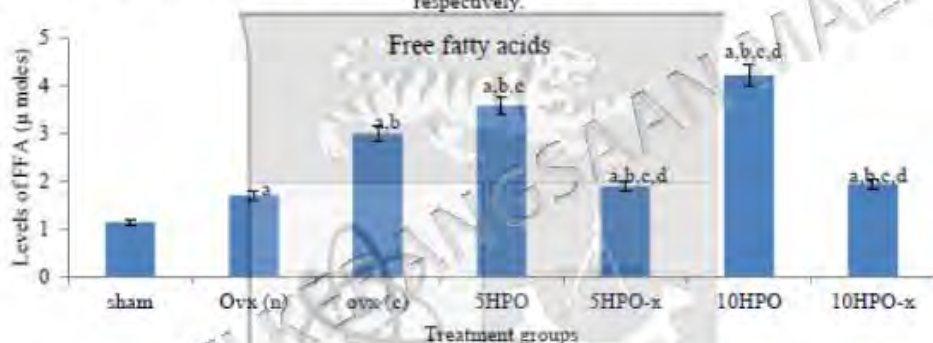


Figure 5: Effect of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the cardiac FFA level. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5HPOX), palm oil heated 10 times (10HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10HPOX). The bars represent mean, and error bars, SD, with $n = 6$ in each group. $p < 0.05$ indicates significant difference compared to ^asham, ^bOvX (n), ^cOvX (c), ^d5HPO and ^e5HPO-x groups respectively.

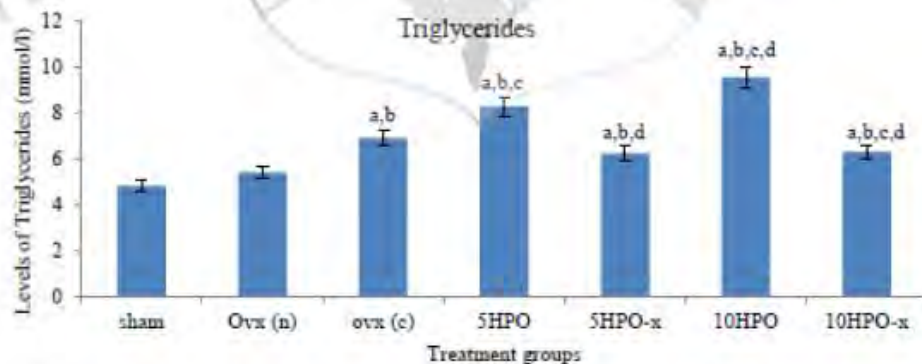


Figure 6: Effect of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the cardiac triglycerides level. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5HPOX), palm oil heated 10 times (10HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10HPOX). The bars represent mean, and error bars, SD, with $n = 6$ in each group. $p < 0.05$ indicates significant difference compared to ^asham, ^bOvX (n), ^cOvX (c), ^d5HPO and ^e5HPO-x groups respectively.

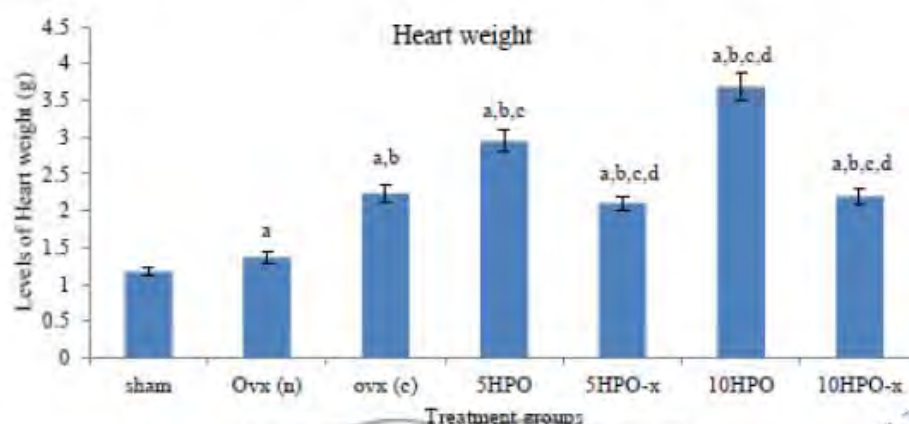


Figure 7: Effect of ADD-X and repeatedly heated palm oil on heart weight. Cholesterol diet (Chol-C), palm oil heated 5 times (5HPO), ADD-X with palm oil heated 5 times (5HPO-x), palm oil heated 10 times (10HPO), ADD-X with palm oil heated 10 times (10HPO-x). The bars represent mean, and error bars, SD, with $n = 6$ in each group. $p < 0.05$ indicates significant difference compared to ^asham, ^aOvx (n), ^aOvx (c), ^a5HPO and ^a5HPO-x groups respectively.

repeated three times. Complete removal of liquid at each step is essential. After the last wash, the remaining Wash Buffer was removed by aspiration or decantation. The plate was inverted and patted it against thick clean absorbent paper. An amount of 100 μ L of HRP Conjugate working solution was added to each well and covered with the plate sealer and incubated for 30 minutes at 37°C. The washing process was repeated for five times and 90 μ L of Substrate Solution was added to each well, covered and incubated for about 15 minutes at 37°C. The plate was protected from light and 50 μ L of Stop Solution was added to each well. When the color turned yellow the optical density of each well was determined at once, using a micro-plate reader set to 450 nm.

Assay of CRP

Serum CRP level was determined using a commercially available ELISA kit by the method of Amran et al.¹³ with little modifications. The intensity of coloured product was measured using a Thermo scientific micro plate reader (USA) at 450 nm absorbance. Values of samples were calculated by the software provided with the micro plate reader and compared to the standard curve generated.

Assay of TNF- α

Serum TNF- α level was determined using a commercially available ELISA kit by the method of Amran et al.¹³ with little modifications. An amount of 100 μ L of standard or sample was added to each well and incubated for 90 minutes at 37°C. After that the liquid was removed and 100 μ L of Biotinylated Detection Ab was added and further incubated for another hour at 37°C. This was then aspirated and washed 3 times. An amount of 100 μ L of HRP Conjugate was further and incubated for another 30 minutes at 37°C. This was then aspirated and washed 5 times. An amount of 90 μ L of Substrate Reagent was further added and incubated for 15 minutes at 37°C. Finally, the 50 μ L Stop Solution was added and read at 450 nm immediately.

Assay of cardiac TGL

The Cardiac triglycerides level was determined using a commercially available ELISA kit by the method of Zhao and Erdman¹⁴ with little modifications. 10 mL of diluted standards and samples were added into wells of a clear 96-well plate. Working Reagent was prepared for each well, by mixing 100 μ L Assay Buffer, 2 μ L Enzyme Mix, 5 μ L Lipase, 1 μ L ATP and 1 μ L Dye Reagent in a clean tube. 100 μ L of Working Reagent was transferred into standards and sample wells. The plate was tapped to mix and incubated 30 min at room temperature, and finally the optical density was read at 570 nm.

Assay of cardiac FFA

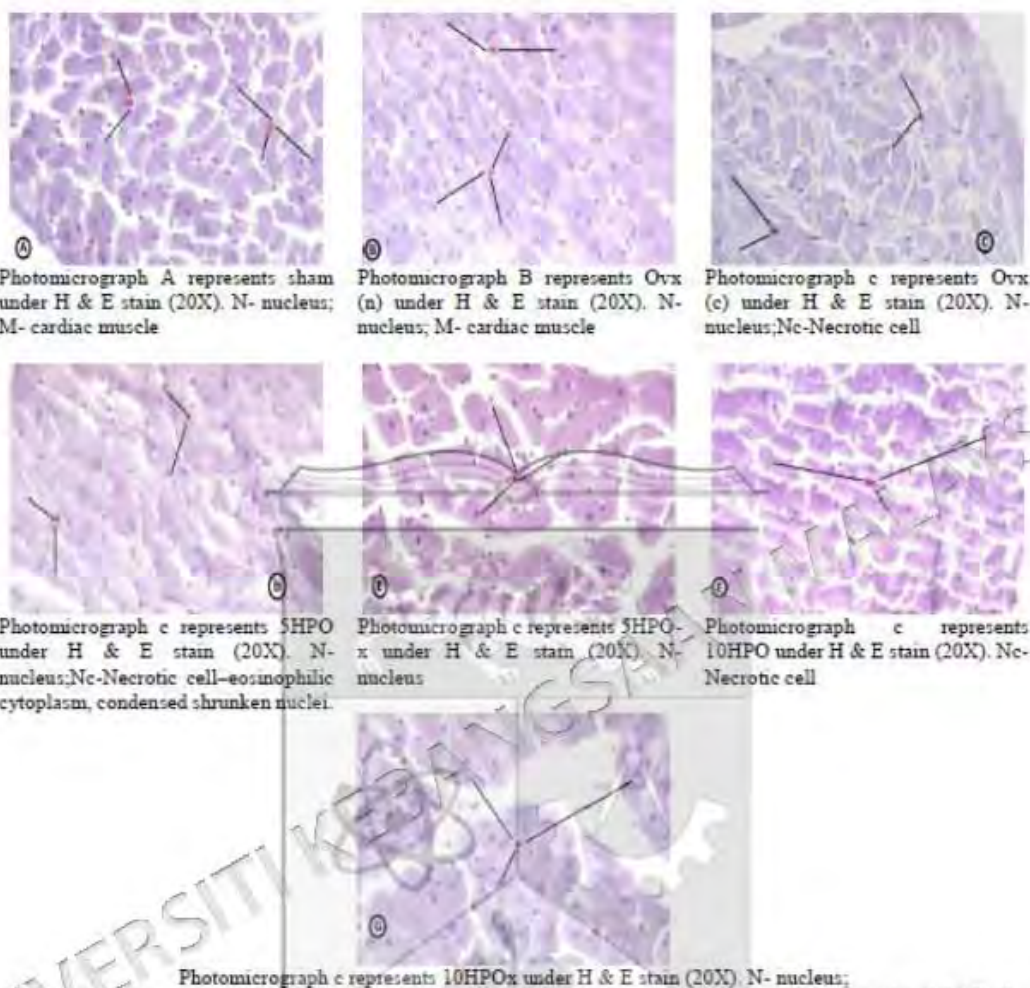
The Cardiac free fatty acids level was determined using a commercially available ELISA kit by the method of Jelinek et al.¹⁵ with little modifications. 10 mL diluted standards and samples were added into wells of a clear 96-well plate. Working Reagent was prepared by mixing, 90 μ L Assay Buffer, 1 μ L Enzyme A, 1 μ L Enzyme B, 1 μ L CoSubstrate and 1 μ L Dye Reagent in each well. An amount of 90 μ L of Working Reagent was added to each well. The plate was tapped to mix and incubated 30 min at room temperature, and finally the optical density was read at 570 nm.

Cardiac tissue Preparation

The specimens were sectioned longitudinally, and fixed heart tissues were embedded with paraffin using tissue-embedding center (LEICA EG 1160, Wetzlar, Germany). Tissues were sliced (MICROM HM 340E, Walldorf, Germany) and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for light microscopy (BX-40; Olympus, Tokyo, Japan). Histological examination was carried out at magnifications of 20X and 100X.

Statistical analysis

The results for the BP, lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels were presented as percentages of the baseline values. All data analyses were conducted using SPSS version 22. The normality of the data was determined by Kolmogorov-Smirnov test. The peroxide



Photomicrograph A represents sham under H & E stain (20X). N- nucleus; M- cardiac muscle

Photomicrograph B represents Ovx (n) under H & E stain (20X). N- nucleus; M- cardiac muscle

Photomicrograph c represents Ovx (c) under H & E stain (20X). N- nucleus; Nc- Necrotic cell

Photomicrograph c represents 5HPO under H & E stain (20X). N- nucleus; Nc- Necrotic cell- eosinophilic cytoplasm, condensed shrunken nuclei.

Photomicrograph c represents 5HPO-x under H & E stain (20X). N- nucleus

Photomicrograph c represents 10HPO under H & E stain (20X). Nc- Necrotic cell

Photomicrograph c represents 10HPOx under H & E stain (20X). N- nucleus;

Figure 8: Photomicrograph represents longitudinal section of cardiac tissue in sham, reheated palm oil and ADD-X treated groups under H & E stain (20X).

values among the edible oil groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Honestly Significant Differences post-hoc test for differences between pairs of means when applicable. To analyze the differences in the BP activities and the levels of lipid peroxidation among the experimental groups, the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were performed. Statistical significance was defined as $P < 0.05$. Data are expressed as means (SD).

RESULTS

Inflammatory markers

The repeatedly heated palm oil caused a significant increase ($p < 0.05$) in the C - reactive protein (CRP) and Tumor necrosis factor α (TNF- α). The level of CRP and TNF- α were significantly reduced with ADD-X supplementation (Figure 1 and 2).

Cardio biomarkers

The repeatedly heated palm oil caused a significant increase ($p < 0.05$) in cardiac lactate dehydrogenase (LDH) and troponin levels. The level of LDH and troponin levels significantly reduced with ADD-X supplementation (Figure 3 and 4)

Cardiac of free fatty acids (FFA) and triglycerides (TG)

The reheated palm oil groups cause a significant increase ($p < 0.05$) in cardiac tissue free fatty acids (FFA) (Figure 5) and triglycerides (TG) (Figure 6) levels at the end of study. The cardiac level of FFA and TG were markedly attenuated with ADD-X.

Changes in heart weight

There was a significant increase ($p < 0.05$) in heart weight in groups fed with repeatedly heated palm oil compared to the control, ADD-X treated groups and sham groups as shown in Figure 7.

Microscopic Changes in Cardiac Tissue

Large, rounded nuclei were centrally located in the cardiac muscle fiber in the control group. A similar pattern was found in the group fed with Ovx (N). Presence of necrotic cells in cardiac tissues of the groups fed with 5HPO and 10HPO were noted. Necrotic cells could be identified by the eosinophilic characteristic that stained bright pink compared to the surrounding normal cells. This was due to the degeneration of the structural protein in cytoplasm that led to the formation of a homogeneous mass. Furthermore, necrotic cells had smaller nuclei compared to the normal nuclei. Pyknosis or nuclei condensation could be observed as a result of the coagulation of chromatin in nuclei, forming a basophilic area following hematoxylin staining. Necroses were noted and more severe in cardiac tissue of the groups fed with 10HPO compared to the 5HPO group. However, there were no significant changes in cardiac histology for control and group fed with ADD-X.

DISCUSSION

Inflammations have been implicated in pathogenesis of atherosclerosis and have been exposed to be connected with an increase in inflammatory biomarkers such as C-reactive protein (CRP), and Tumour Necrosis Factor- α ^{13,16,17}. These inflammatory biomarkers have been identified as high risk factors for CVD such as hypertension and atherosclerosis^{18,19}. In the present study, the increased expression of CRP and TNF- α were seen in 5HPO and 10HPO treated groups. This finding suggests that heated palm oil cause inflammation that predispose to CVD. This finding was comparable the finding of Ng et al.¹⁷ that reported heated vegetable oil cause vascular inflammation. ADD-X supplementation attenuates the increase in CRP and TNF- α suggests ADD-X has anti-inflammatory effect. ADDX is rich in polyphenols which may be responsible for the anti-inflammatory effect. The anti-inflammatory effect of polyphenols was reported by Li et al.²⁰ and Aziz et al.²¹. The protective effect of antioxidant such as polyphenol on CVD was already reported before^{22,23}. Elevation in the troponin and lactate dehydrogenase (LDH) activity also indicates the disturbance in the normal cardiac functions²⁴. In the present study, the levels of troponin and LDH activity were increased in 5HPO and 10HPO treated groups, which may suggests that reheated palm oil might have caused cardiac injury. Our finding was in line with Hamai et al.²⁵ which reported that heated virgin coconut oil increase LDH and troponin which might indicate cardiac injury. Again the reduction in LDH and troponin by ADD-X suggests polyphenols rich antioxidant has protective effect on the heart. These cardiac injuries may be due to inflammatory reactions caused by the ROS and it was generated by the thermal oxidation of repeatedly heating oil, and this caused the endothelial cell injury in heart²⁶. In the present study, histological study of heart showed necrosis in cardiac tissue of 5HPO and 10HPO groups with the latter showing more severity. This finding was similar to Leong et al.²⁷ confirmed necrotic cells and myolysis in cardiac tissues. Histopathology changes of this study was supported by earlier investigation by Shastry et al.²⁸ and Farag Radwan et al.²⁹ which showed the broad fatty vacuolation present

in the cardiac muscle fibres and packed myocardial and vacuolation in papillary muscles respectively. The histological changes of the cardiac tissues appear to be preserved by ADDX. Polyphenols were reported to preserve cardiac tissue³⁰. Cardiac toxicity of heated palm oil was also reported by Edem³⁰ who, suggested the cardiac toxicity was due to lipid peroxidation. Our previous finding showed that heated oil increased TBARS and peroxide value suggest s heated oil increased lipid peroxidation which was reduced by ADD-X administration³¹. The possible mechanism on how heated oil cause cardiac toxicity was unclear. Cardiac tissue is provided with great numbers of mitochondria for blood circulation in the body. We believe that lipid peroxidation induced by heated oil cause mitochondrial damage as the mitochondria is the important site for oxidative phosphorylation and ATP formation. Ozawa³² reported that free radicals may cause cell death. Cell deterioration is caused by biochemical abnormalities and structural changes. Prolonged cell deterioration cause cell necrosis³³ as shown in the present study. Despite the difference in the degree of heating process, the food intake of the treatment groups were high and higher intake of fat diet (2% cholesterol) was associated with increase in their heart weight. In this study, we found that the biochemical and histological changes was associated with increase in cardiac's weight. This finding was in agreement with an earlier study reporting that in rats fed with oxidized palm oil, an increase in organ weights including the heart was found³⁴. We are not sure of the mechanism behind this finding. We postulated that the increased in cardiac weight was likely due to the increased in food intake and weight gain. The increased in food intake lead to accumulation of TG and FFA in cardiac tissue. The increase in cardiac weight was lower with ADD-X supplementation as ADD-X reduced food intake and weight gain, therefore it caused less FFA and TG accumulation in the cardiac tissue.

CONCLUSION

The findings of this study suggest that the consumption of reheated palm oil caused inflammation which produce detrimental effect on cardiac tissues, in an estrogen-deficient state. The consumption of ADD-X with palm oil restores these markers enzymes and protects the cardiac tissues from the necrotic effects by its antioxidant potential. ADD-X appears as stable antioxidant even though it has been treated at high temperature; therefore, it may be use as suitable additive to prevent heated-oil-induced cardiac changes.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the KPM Ministry of Higher Education. There are no conflicts of interest regarding each of the authors involved in this research work.

REFERENCES

1. Falade AO, Oboh G, Ademiluyi AO, Odubanjo OV. Consumption of thermally oxidized palm oil diets alters biochemical indices in rats. Beni-Suef University

- Journal of Basic and Applied Sciences 2015; 4: 150-156
2. Choe E, Min DB. Chemistry and reactions of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science* 2007; 72 (5): R77-R86.
 3. Jaarin K, Mustaffa MR, Leong XF. The effect of heated vegetable oils on blood pressure in rats. *Clinics* 2011; 66(12): 2125-2132.
 4. Ng CY, Kamisah Y, Faizah O, Jaarin K. The role of repeatedly heated soybean oil in the development of hypertension in rats: association with vascular inflammation. *Int J Exp Pathol* 2012; 93(5): 377-387.
 5. Leong XF, Ng CY, Jaarin K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *BioMed Research International* 2015, Article ID 528757, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/528757>
 6. Adam SK, Soelaiman IN, Nor Amir Umar, Norhayati Mokhtar, Norazlina Mohdmed, Kamariah Jaarin. Effects of Repeatedly Heated Palm Oil on Serum Lipid Profile, Lipid Peroxidation and Homocysteine Levels in a Post-Menopausal Rat Model. *McGill Journal of Medicine* 2008; 11(2): 145-151.
 7. Adam SK, Das S, Othman F, Jaarin K. Fresh soy oil protects against vascular changes in an estrogen-deficient rat model: an electron microscopy study. *Clinics* 2009; 64(11): 1113-1119.
 8. Ng CY, Leong XF, Masbah N, Adam SK, Kamisah Y, Jaarin K. Heated vegetable oils and cardiovascular disease risk factors. *Vascular Pharmacology* 2014; 61: 1-9
 9. Leong XF, Ng CY, Jaarin K, Mustaffa MR. Effects of Repeated Heating of Cooking Oils on Antioxidant Content and Endothelial Function. *Austin J Pharmacol Ther.* 2015; 3(2):1068
 10. Mohamed S, Nor FM. Cooking oil composition with additive to reduce oil absorption, United States Patent. 2013; 8,425,969 B2.
 11. Owu DU, Osum EE, Ebong PE. Serum liver enzymes profile of Wistar rats following chronic consumption of fresh or oxidized palm oil diets. *Acta Tropica* 1998; 69: 65-73.
 12. Hanson DG, Juhn SK, Griebink GS, Paparella MM. Lactate dehydrogenase as a measure of inflammation in experimental otitis media. *Archives of Otolaryngology* 1978; 104(6): 333-335.
 13. Amran AA, Zakaria Z, Faizah O, Das S, Hesham AMM. Changes in the vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 and c-reactive protein following administration of aqueous extract of piper sarmentosum on experimental rabbits fed with cholesterol diet. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 2.
 14. Zhao JR, Erdman JW. Phytic acid in health and disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35(6): 495-508
 15. Jelinek D, Castillo JJ, Richardson LM, Luo L, Heidenreich RA, Garver WS. The Niemann-Pick C1 Gene Is Downregulated in Livers of C57BL/6J Mice by Dietary Fatty Acids, but Not Dietary Cholesterol, through Feedback Inhibition of the SREBP Pathway. *J Nutr.* 2012; 142(11):1935-1942. doi: 10.3945/jn.112.162818
 16. Ng CY, Kamisah Y, Faizah O, Jaarin K. The role of repeatedly heated soybean oil in the development of hypertension in rats: association with vascular inflammation. *Int J Exp Pathol* 2012; 93: 377-387.
 17. Ng CY, Kamisah Y, Faizah O, Jubri Z, Qodriyah HMS, Jaarin K. Involvement of Inflammation and Adverse Vascular Remodelling in the Blood Pressure Raising Effect of Repeatedly Heated Palm Oil in Rats. *Int J Vascul Med Volume* 2012; Article ID 404025, 10 pages doi:10.1155/2012/404025
 18. Sesso HD, Buring JE, Rifkin N. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 2003; 290: 2945-2951.
 19. Pai JK, Pischon T, Ma J. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *NEJM* 2004; 351: 2599-2610.
 20. Li, S-H, Zhao P, Tian HP, Chen LH, Cui LQ. Effect of Grape Polyphenols on Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE* 2015; 10 (9): e0137665.
 21. Aziz NUA, Othman F, Yusof K, Jaarin K, Das, S. Effect of curcumin on the cardiovascular system of ovariectomized experimental rats fed with high cholesterol and heated palm oil diet. *British Journal of Biomedical Science* 2012; 1(1): 63-73.
 22. Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R. Wine Polyphenols Decrease Blood Pressure, Improve NO Vasodilatation, and Induce Gene Expression. *Hypertension*. 2001; 38: 159-165.
 23. Jaarin K, Masbah Norhiana, Yusof Kamisah, Mohammad Nursyafiza and Hj Mohd Saad Qodriyah. Potential role of virgin coconut oil in reducing cardiovascular risk factors. *Experimental and Clinical Cardiology* 2014; 20(8): 3399-3410
 24. Risenfors M, Hartford M, Dellborg M, Luepker R, Hjalmarsson K, Swedberg K. Effect of early intravenous rt-PA on infarct size estimated from serum enzyme activity: results from the TEAHAT study. *J Intern Med Suppl* 1991; 734:11-18.
 25. Hamsi MA, Faizah Othman, Srijit Das, Yusof Kamisah, Zar Chi Thent, Haji Mohd Saad Qodriyah, Zaiton Zakaria, Adel Emran, Kogilavani Subermaniam, Kamariah Jaarin. Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and inflammatory biomarkers: An experimental study in Sprague Dawley rats. *Alex J Med* (2014); <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2014.02.002>.
 26. Leong XF, Salimon J, Mustafa MR, Jaarin K. Effect of Repeatedly Heated Palm Olein on Blood Pressure-Regulating Enzymes Activity and Lipid Peroxidation in Rats. *Malays J Med Sci.* 2012; 19(1): 20-29.
 27. Leong XF, Aishah A, Nor Aini U, Das S, Jaarin K. Heated palm oil causes rise in blood pressure and cardiac changes in heart muscle in experimental rats. *Arc Med Res* 2008; 39(6): 567-572
 28. Shastry CS, Narendrakumar Ambalal P, Himonshu J. Evaluation of effect of reused edible oil on vital organs

- of wister rats. Nitte University of Health Science 2011; 1: 10-15.
29. Farag Radwan S, Abdel-Latif, Mohamed S. Effect of non-fried and fried oils of varied fatty acid composition on rat organs. *Agrand Biol J North Am* 2010; 1 (4): 501-509.
30. Edem DO. Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, haematological, and toxicological aspects: a review. *Plant Foods Human Nutrition* 2002; 57:319-41.
31. Sukalingam K, Faizah Othman, Saad QHM, Mohamed S, Jaarin K. Consumption of ADD-X and repeatedly heated palm oil on the blood pressure and oxidative stress markers in ovariectomized rats. *Int J Pharmacol*. 2016; (Article in Press)
32. Ozawa T. Mitochondria in cellular aging and degeneration. In: Cadenas E, Packer L, eds. *Understanding the Process of Aging: The Roles of Mitochondria, Free Radicals and Antioxidants*. New York: Marcel Dekker;1999; 265-292.
33. Chandrasoma P, Taylor CR. *Concise Pathology: Cell Degeneration and Necrosis*. Singapore: McGraw-Hill; 2001.
34. Osim EE, Owu DU, Isong EU, Umoh IB. Influence of chronic consumption of thermooxidized and fresh palm oil diets on basal metabolic rate, body weight and morphology of tissue in rats. *Discov Innov* 1994; 6: 389-396.



LAMPIRAN X

Manuskrip yang telah Diterima dan Diterbitkan oleh *Medicine & Health**Med & Health 2016; 11(2): 171-180*<https://doi.org/10.17576/MH.2016.1102.06>

ORIGINAL ARTICLE

Development of Hypertensive Animal Model Using Ovariectomised Rat Fed with Short-Term 2% Cholesterol Diet

KUMFUSI HINI S¹, NURSI HAZANA A¹, FAIZAH O¹, KAMSIALI P, SRIJIT D¹,
ZAR CHH T^{1,2}

¹Department of Anatomy, ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, A Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia.

¹Anatomy Unit, Faculty of Medicine, Universiti Teknologi MARA, 47000 Sungai Buloh, Selangor, Malaysia.

ABSTRAK

Menopaus merupakan pemberhentian pendarahan haid, ia secara langsung berkaitan dengan penyakit kardiovaskular (CVD) seperti tekanan darah tinggi dan strok. Pengurangan estrogen dan pengambilan diet berkolesterol tinggi mempunyai kesan yang menjejaskan fungsi kardiovaskular dan metabolisme pada wanita. Kajian ini bertujuan untuk menghasilkan model tikus hipertensi dalam tikus *Sprague-Dawley* ovariectomi yang diberi makan dengan 2% diet kolesterol dalam tempoh jangka pendek. Lapan belas tikus *Sprague-Dawley* dibahagikan secara rawak kepada tiga kumpulan iaitu kumpulan kawalan Sham (sham), kumpulan kawalan terovariectomi diberi diet normal (Ovx + N), tikus terovariectomi diberi diet kolesterol 2% (Ovx + Cho) selama empat minggu. Pada akhir kajian, pengambilan makanan dan berat badan diukur. Tekanan darah sistolik, diastolik dan tekanan min darah ditentukan. OVX + Cho menunjukkan peningkatan yang ketara dalam perubahan fisiologi seperti berat badan dan pengambilan makanan berbanding dengan kumpulan Ovx + N. Peningkatan yang ketara dalam tekanan darah sistolik, diastolik dan tekanan min darah diperhatikan dalam kumpulan Ovx + Cho. Berdasarkan hasil kajian di atas, dipensyaki bahawa makanan berkolesterol selama empat minggu (jangka pendek) menyebabkan peningkatan ketara dalam tekanan darah, pengambilan makanan dan berat badan dalam tikus terovariectomi.

Kata kunci: tekanan darah, berat badan, kolesterol, diet, terovariectomi, tikus

ABSTRACT

Menopause, a cessation of menstrual bleeding, is directly related to serious illness confined to cardiovascular disease (CVD) such as hypertension and

Address for correspondence and reprint requests: Zar Chh Theen, Anatomy Unit, Faculty of Medicine, Universiti Teknologi MARA, Jalan Hospital, 47000 Sungai Buloh, Selangor, Malaysia. Tel: 006-3-61267300; Fax: 006-3-61267507; E-mail: zarchh@gmail.com

stroke. The oestrogen withdrawal and consumption of high cholesterol diet has a detrimental effect on cardiovascular function and metabolism in menopausal women. The present study was aimed to develop the hypertensive rat model in the ovariectomised Sprague Dawley rats fed with 2% cholesterol diet following a short term period. Eighteen Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups; Sham control (sham), ovariectomized control fed with normal diet (Ovx +N), ovariectomized rats fed with 2% cholesterol diet (Ovx + Cho) for four weeks. At the end of the study, the food intake and body weight were measured. The systolic, diastolic and mean blood pressure was determined. OVX+Cho showed significant increase in physiological changes such as body weight and food intake compared to Ovx+N group. The significant increase in systolic, diastolic and mean blood pressure was observed in Ovx+Cho group. Based on the above findings, it is believed that feeding cholesterol diet for four weeks (short term) results in significant increase in the blood pressure, food intake and body weight in the ovariectomised rats.

Keywords: blood pressure, body weight, cholesterol, diet, ovariectomised, rats

INTRODUCTION

Menopause is the permanent cessation of menstruation resulting from the loss of ovarian follicular activity which occurs after 12 consecutive months of amenorrhea without any pathological or physiological cause (WHO, 1994). The timing of natural menopause is variable, however, it can occur in the women with age range from 45-55 years. Menopause has detrimental effects on cardiovascular function and metabolism in women (Leong et al. 2008). Menopause is associated with cardiovascular disease (CVD) including hypertension, obesity, stroke, myocardial infarction and renal failure (Bray 2003; Leong et al. 2015). Among all the complications related to the menopause, obesity is an important one to be highlighted. Postmenopausal obesity results in increased risk of many diseases, such as

diabetes, hypertension, heart diseases, atherosclerosis and breast cancer (Bray 2003). Several experimental studies used ovariectomised rats as a menopausal model for the tentative researches (Leong et al. 2015).

High Blood Pressure is defined as systolic blood pressure (SBP) greater than 140 mmHg and/or diastolic blood pressure (DBP) greater than 90 mmHg (Bray 2003). Increase in the blood pressure is the most common symptom in the CVD and is a main source of morbidity and mortality worldwide. Approximately, 90-95% cases of hypertension are idiopathic. It is a complex, multifactorial disorder, including genetic and lifestyle modifications (Leong et al. 2015). Based on the epidemiological surveys, several factors are linked with an increase in the blood pressure and these include age, sex, race, socioeconomic status, emotional disturbances, nutrition,

increase in the body weight, alcohol consumption, physical activity and exposure to various environmental agents. In Malaysia, data from the National Health and Morbidity Survey reported that 37% of the population developed hypertension (Institute of Public Health 2008).

The occurrence of increase in blood pressure and CVD are less in women compared to men of similar age and this is due to the sufficient oestrogen level present in the reproductive age of the women (Zago et al. 2004). However, the oestrogen levels gradually diminish at the age of menopause and predispose to several diseases including obesity and hypertension. Oestrogen has been proven to exhibit cardioprotective effects in pre-menopausal women. A number of studies reported that the incidence of hypertension and menopausal are highly correlated (Zago et al. 2004; Derpo & Korach 2006; Adam et al. 2009). Few studies presumed that the consumption of improper diet (high sodium diets, high cholesterol diet) has a high risk of developing elevated blood pressure in the postmenopausal state.

There are *in vivo* and *in vitro* studies which were conducted to observe the effect of cholesterol rich diet on major blood vessels (Jaarin et al. 2015; Nuruliman et al. 2013; Leong et al. 2015). Significant changes were observed in the pathophysiology of the aorta following the cholesterol rich diet in ovariectomised rats. It is noteworthy that the commercial cholesterol rich diet is cost expensive. Prolonged consumption of cholesterol diet

(more than 24 weeks) led to develop hypertension in the ovariectomised rats (Jaarin et al. 2015; Leong et al. 2015). It was important to observe the effect of short term consumption of cholesterol diet on hypertension which may result in low consuming of cholesterol diet. The effect of 2% cholesterol diet on the blood pressure was also to be investigated. Hence, the present study was aimed to develop hypertensive ovariectomised rat model following the consumption of 2% cholesterol in the normal diet in a short term period.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS AND DIETS

Eighteen female Sprague-Dawley rats with weighing 250 ± 50 g were obtained from Animal unit, Universiti Kebangsaan Malaysia. The rats were kept in stainless steel cage at temperature 20–22°C and 12:12 h light cycle). The rats were acclimatized for 7-days and were given free access to food and water. Prior ethical approval was obtained. Two percent cholesterol diet was purchased from Next Gene Scientific Sdn Bhd, Singapore.

STUDY DESIGN

The rats were randomly divided into three groups of six animals ($n=6$) each; sham control (Sham), ovariectomised control fed with standard rat chow (Ovx+N) and ovariectomised control fed with 2% cholesterol (Ovx+Chol). Following the ovariectomy, the treatment was continued for 4 weeks.

PROCEDURE FOR OVARIECTOMY

All the animals except Sham group were ovariectomised following intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride and xylazine (50 and 10 mg/kg body weight, respectively). Bilateral ovariectomies were performed from a dorsal approach. Following 2 weeks of ovariectomy, Sham and Ovx+N groups received normal diet. Normal diet with additional 2% cholesterol was given to Ovx+ Cho (Adam et al. 2009).

MEASUREMENT OF FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT

Food intake and body weight were measured at weekly intervals for four weeks in all the groups. Measurement of food intake was calculated by subtracting the total amount provided to the remaining amounts in the cage (Abdulla et al. 2011). Body weight was measured by using the electronic weighing scale. The increase in the body weight was calculated by deducting the final weight from the initial weight.

BLOOD PRESSURE MEASUREMENT

Prior to measure the blood pressure, the rats were made unconscious by inhalation of diethyl ether. Blood pressure of the unconscious rats were measured at the baseline and at the end of the experiment. It was measured by using the non-invasive tail-cuff method with sphygmomanometer technique using COXA system (a computerized monitor system) (Aida Azlina et al. 2009). Minimum of three measurements were taken

consecutively and the average was then determined as a final measurement for SBP, DBP and mean blood pressure (Aida Azlina et al. 2009).

STATISTICAL ANALYSIS

All data analyses were conducted using SPSS version 22. The normality of the data was determined by Kolmogorov-Smirnov test. The food intake and body weight changes among groups were compared using two-way ANOVA with Tukey post-hoc test. Statistical significance was defined as $P < 0.001$. Data are expressed as means (\pm SEM).

RESULTS

FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT

In the present study, the changes in the food intake and body weight of the animals following 4 weeks of consumption of 2% cholesterol diet was determined (Table 1). The food intake between Ovx+Cho and Ovx+N; Ovx+N and Sham groups were compared. It was shown that Ovx+Cho group (food intake 252.7 ± 9.17 g; body weight 278.43 ± 13.9 g) had a significant increase in food intake and body weight at the end of 4th week of the study compared to Ovx+N group (172.9 ± 9.67 g; 247.43 ± 15.23 g, respectively) ($p < 0.001$). Although, there was a significant increase in food intake in Ovx+N group (172.9 ± 9.67 g) compared to sham group (152.9 ± 6.83 g), the non-significant difference in body weights was found between Ovx+N (247.43 ± 15.23 g) and Sham group (240.43 ± 12.23 g) ($p > 0.001$). Less

Table 1: Food intake and body weight gain in rats fed with respective normal and 2% cholesterol diet

Groups	Food intake (g/weeks)					Body Weight (g)				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Sham	142.5	147.6	150.2	153.4	152.9	200.43	210.17	217.36	210.32	240.43
	± 5.61	± 5.38	± 5.41	± 6.98	± 6.83	± 14.13	± 15.22	± 13.95	± 14.78	± 12.23
Ovx+N	140.7	145.6	154.2	160.4	172.9	203.43	214.17	220.36	234.32	247.43
	± 9.67	± 7.35	± 8.34	± 8.98	± 9.67 ^{ns}	± 12.16	± 14.22	± 18.97	± 14.56	± 13.23 [*]
Ovx+Cho	144.7	156.6	169.5	205.3	232.7	208.43	218.73	235.23	256.17	278.43
	± 8.13	± 4.67	± 7.37	± 5.67	± 9.17 [*]	± 13.90	± 11.65	± 15.30	± 17.5	± 13.9 [*]

Each value is expressed as the mean ± SEM (n=6). *p<0.05; Sham Vs Ovx+N; ^{ns}p>0.05; Ovx+Cho Vs Ovx+N; ^{*}p<0.05; Sham Vs Ovx+N.

significant findings of food intake and body weights were observed between the groups at the different weeks of the study (week 0,1,2 and 3).

SYSTOLIC BLOOD PRESSURE MEASUREMENT

The weekly systolic blood pressure was measured in normal and cholesterol fed groups with normal diet fed ovariectomised rats. The results were compared between the groups at the end of the study (i.e at 4th week of experimental period) (Figure 1). It was observed that Ovx+Cho group showed a significant increase in systolic blood pressure (128.2 ± 9.8 mmHg) compared to Ovx+N group (115.1 ± 8.7 mmHg) ($p<0.001$). No significant increase in systolic blood pressure was observed in the Ovx+N group compared to Sham group (112.2 ± 8.3 mmHg) ($p>0.001$). There was no significant difference noted in the systolic blood pressure of Ovx+ Cho and Ovx+N groups; Ovx+N and sham groups at different week interval (week 0,1,2 and 3).

DIASTOLIC BLOOD PRESSURE MEASUREMENT

The weekly diastolic blood pressure was measured in normal and cholesterol diet fed ovariectomised rats and the results were compared between the groups at the end of the study (Figure 2). It was observed that the Ovx+Cho group showed a significant increase in diastolic blood pressure (95.2 ± 9.8 mmHg) compared to Ovx+N group (76.4 ± 9.2 mmHg) ($p<0.001$). No significant increase in diastolic blood pressure was observed in the Ovx+N group compared to Sham group (77.5 ± 9.7 mmHg) ($p>0.001$). The non-significant differences in diastolic blood pressure were observed at different week interval between the groups.

MEAN BLOOD PRESSURE MEASUREMENT

The weekly mean blood pressure was measured in normal and cholesterol diet fed ovariectomised rats and the results were compared between the groups at the end of the study (Figure

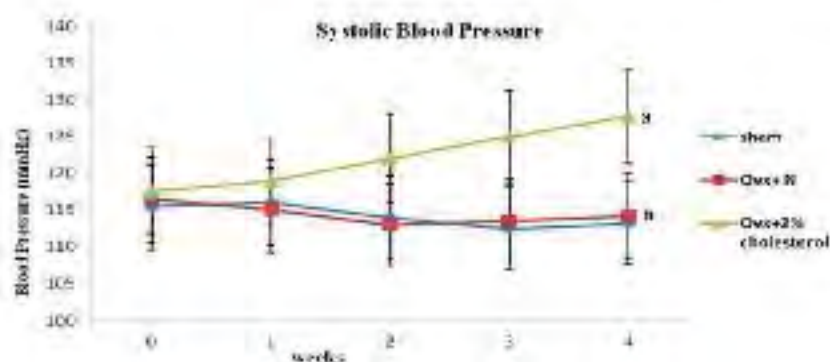


Figure 1: Measurement of systolic blood pressure in normal and cholesterol diet fed ovariectomised rats

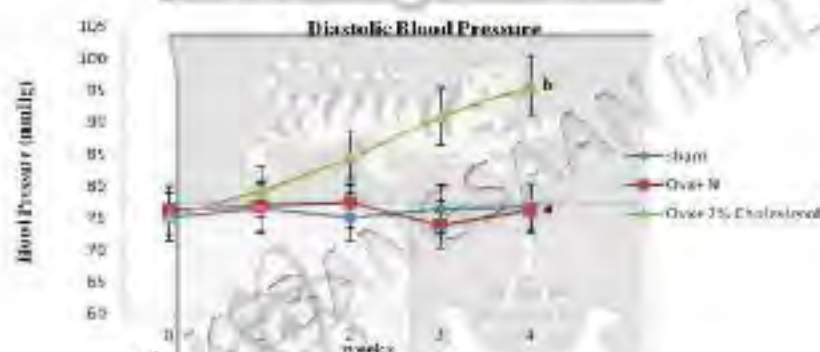


Figure 2: Measurement of diastolic blood pressure in normal and cholesterol diet fed ovariectomised rats

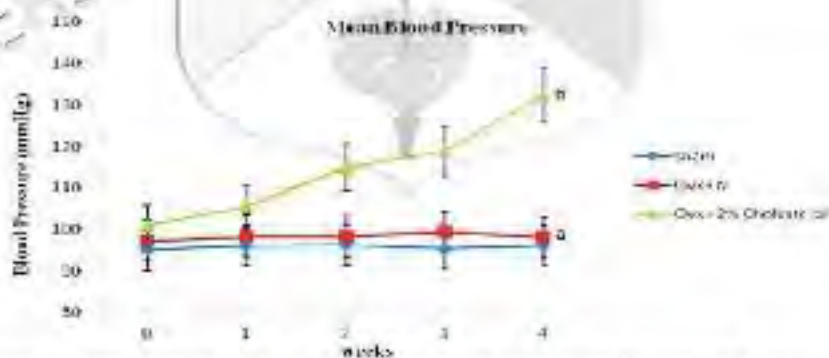


Figure 3: Measurement of mean blood pressure in normal and cholesterol diet fed ovariectomised rats

3). It was observed that the Ovx+Cho group had a significant increase in the mean blood pressure (135.2 ± 7.3 mmHg) compared to the Ovx+N

group (96.7 ± 4.9 mmHg) ($p < 0.001$). No significant increase in mean blood pressure was observed in the Ovx+N group compared to Sham group (95.5 ± 5.3 mmHg) ($p > 0.001$).

DISCUSSION

Several clinical and experimental studies were carried out to investigate the complications that occurred in the postmenopausal state. Ovariectomized Sprague Dawley rats are used as the animals resemble the postmenopausal state of the human (Lalou et al. 2001). With regard to the duration of the study, it is worth to know that there are several studies of cholesterol diet on short and long term period. According to the literature, short term period is presumed from 7 days to 4 weeks/less than 5 weeks and long term period is between 5-24 weeks of dietary cholesterol consumption. These durations are widely used in the atherosclerosis related cholesterol diet researches (Lichtenstein et al. 1994, Brown et al. 1992).

The present study used the ovariectomized rats to determine the changes in the blood pressure, body weight and food intake following 4 weeks or consumption of 2% cholesterol diet. The food intake and body weight was compared between Ovx1 Cho and Ovx+N groups: Ovx+N and sham groups. It was found out that there was a significant increase in the body weight and food intake in Ovx+Cho group compared to Ovx+N group (Table 1). The underlying mechanism related to the increased food intake in ovariectomized group fed with cholesterol is poorly

understood. Yet, it was stated that cholesterol levels are strongly linked with the dietary intake. According to the literatures, the individual consuming more cholesterol in daily diet in lines to have increase food intake compared to the individuals with normal diet (Kresser 2013). Our findings agreed with the previous study which reported the significant increase in food intake in experimental rats within the first few weeks of ovariectomy (McHarty & Wade 1987). The increase in the body weight following an increase in food intake might be most probably due to the gradual reduction in lean body mass and progressive fat accumulation in different body regions. Progressive fat accumulation induces oxidative stress and was proven to cause obesity, hypertension and cardiovascular diseases (Park et al. 2016). Previous study observed the weight gain in the ovariectomized rats are due to the oestrogen deficiency resulting an increase in the fat accumulation (Lalou et al. 2001, Shimoda et al. 2002). However, the findings are not in line with the present results as Ovx+N group did not show any significant increase in the body weight compared to the sham group. It can be explained that oestrogen has less influence on the body weight in early onset of postmenopausal state. Based on the present study, the increase in body weight mainly reflect the consumption of cholesterol diet (Table 1). It is proved that the effect of oestrogen deficiency worsens with additional cholesterol intake.

Oestrogen deficiency causes a significant increase in the total

cholesterol and triglycerides, which affects lipoprotein metabolism, platelet aggregation and vessel resistance (Gorodetski & Gorodetski 2007; Jenkins et al. 2006). Previous studies observed that the intake of cholesterol rich food develops obesity and several cardiovascular complications in various animal models (Ali et al. 2006; Kennedy et al. 2010). This high cholesterol diet induces damage to the endothelium of large arteries and heart causing hypertension or increase in the blood pressure and subsequently, produce atherosclerosis resulting coronary heart disease (Ryou et al. 2012).

In the present study, Figure 1, 2 and 3 showed an increase in the systolic, diastolic and mean blood pressure of the Ovx+Cho group. It was observed that consumption of additional 2% cholesterol diet for 4 weeks caused significant changes in the blood pressure measurement. The oestrogen deficiency following ovariectomy and increase cholesterol intake are the predisposing factors of the obesity. In the state of obesity, the fat containing adipose tissue elevates circulating blood volume, plasma volume, and cardiac output, which dilates cardiac cavities and enhances in wall tension resulting in systemic and pulmonary hypertension and sudden death (Poirier et al. 2006). This incidence of hypertension frequently occurs in obese women with poor diet control, modern life style, existing family history and menopausal age (American Heart Association 2007). More than 73% of women aged between 65 to 74 years were reported to have high blood pressure (American Heart Association

2008; Yamakawa et al. 1995). Therefore it is most likely that ovariectomised fed with 2% cholesterol diet (Ovx+Cho group) developed hypertension. No significant changes observed Ovx+N group was most likely due its early onset of postmenopausal state. Oestrogen deficiency is believed effect the physiological changes in prolonged duration. However, lack oestrogen along with consumption cholesterol diet may worsen the above findings even in the early onset.

In a routine research cardiovascular disease, ovariectomised rats fed with cholesterol were used to develop the atherosclerosis animal model. The experiments related with type of animal models are needed to be carried out for a prolonged period (up to 24 weeks) (Lichtenstein et al. 1994; Brown et al. 1991) in order to achieve the significant outcomes atherosclerosis or hypertension. Based on the present findings, it is proven that the use of 2% cholesterol diet induce a significant increase in food intake, body weight and blood pressure ovariectomised rats over 4 weeks (short term period) following ovariectomy. This study showed that consumption of cholesterol diet in early onset postmenopausal state leads to develop hypertension in the experimental animals. Moreover, this study highlighted the serious adverse effect of cholesterol on postmenopausal women. The development hypertensive ovariectomised model in short term period with consumption of 2% cholesterol diet expected to give interesting results.

CONCLUSION

Based on the observations, we concluded that the hypertensive model is established with consumption of 2% cholesterol diet for short term period in ovariectomised rats. The model was easily developed, cost effective and less time-consuming. However, future studies are required to observe the detailed mechanisms related to the cholesterol diet and its potential hypertensive activity.

REFERENCES

- Abdalla, M.H., Saito, M.A., Alabdullati, N.A., Hye-Khan, M.A., Anand Swarup, KR, Johns, DJ. 2011. The contribution of $\alpha 1$ adrenoceptor subtype in the renal vasculature of fructose fed Sprague-Dawley rats. *Exp J Nutr* 50(1): 251-60.
- Adam, S.K., Das, S., Jazrin, K. 2010. A detailed microscopic study of the changes in the aorta of experimental model of postmenopausal rat fed with repeatedly heated palm oil. *Int J Exp Path* 9(03): 221-7.
- Aida Arlina, A., Faridah, H.S., Jazrin, K., Yusoff, M.S., Nur Arlina, M.F. 2009. Effects of Palm sap pressure water extract on $\alpha 1$ Adrenoceptor mediated dehydrogenase β galactosidase activity in ovariectomy-induced stress rats. *Int J Pharmacol* 5(6): 362-9.
- Ali, M., Al-Qattan, K.K., Al-Nezari, I., Al-Shanfari, R.M., Mustafa, I. 2010. Effect of garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62(4): 253-9.
- American Heart Association. 2007. Diseases and Conditions. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifer=1200000>. [12 November 2007].
- American Heart Association. 2008. Heart Disease and Stroke Statistics http://www.americanheart.org/databank/heart/1200007000246405_Scores200808_fin_01.pdf. [12 March 2008].
- Rey, G.A. 2011. Risks of obesity. *Preventive Med* Clin North Am 32(1): 787-804. e18.
- Brown, S.A., Morrisett, J., Patock, J.B., Reeves, R., Gotto, A.M., Patock, W. 1991. Influence of short-term dietary cholesterol and fat on human plasma Lp(a) and LDL levels. *J Lipid Res* 32(8): 1261-9.
- Institute of Public Health (IPH). 2006. The Third National Health and Morbidity Survey 2006 Vol 2. Ministry of Health Malaysia; 199-336.
- Dermo, B.I., Kersch, S.S. 2006. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116(2): 561-70.
- Lorodeski, L.Z., Guruduski, G.J. 2007. Epidemiology and risk factors of cardiovascular disease in postmenopausal women. In: Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinical Aspects, 3rd ed. Edited by Lobo RA. New York: Elsevier; 405-12.
- Jazrin, K., Fong, W.D., Yeoh, M.H., Kamarul, Z.Y., Qodriyah, H.M., Azman, A., Zahale, L.S., Liliana, A.H., Kamariah, Y. 2015. Mechanisms of the anti-hypertensive effects of *Nigella arvensis* oil in L-NAME induced hypertensive rats. *Clinics (Sao Paulo)* 70(11): 751-7.
- Jindag, D.J., Kendall, J.W., Faulkner, J.A., Nguyen, L., Kemp, J., Manolis, A., Wong, J.M., de Souza, R., Bittan, A., Vidgen, E., Trautwein, E.A., Lansley, C.C., Holmes, C., Josse, R.G., Cohen, J.A., Crowley, J.W., Singer, W. 2006. Assessment of the longer-term effects of a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods in hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 83(3):598-601.
- Kennedy, A.J., Flaxon, K.L., King, M.J., Hasty, A.H. 2010. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech* 3(2-3): 156-66.
- Kresser, C. 2013. The Diet-Heart Myth: Cholesterol and Saturated Fat Are Not the Enemy. <https://chriskresser.com/the-diet-heart-myth-cholesterol-and-saturated-fat-are-not-the-enemy/> [19 April 2013].
- Leong, M.G., Shinoda, M., Leveille, J.M. 2001. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol* 91(3):900(3): 335-41.
- Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Carrasco, W., Jennis, J.L., Ordeson, J.M., Schaefer, E.J. 1993. Short-term consumption of a low-fat diet beneficially affects plasma lipid concentrations only when accompanied by weight loss. Hypocholesterolemia, low-fat diet, and plasma lipids. *Arterioscler Thromb* 14(1): 1751-60.
- Leong, X.F., Aishah, A., Nor Aini, U., Das, S., Jazrin, K. 2006. Heated palm oil causes rise in blood pressure and cardiac changes in heart muscle in experimental rats. *Arch Med Res* 37(6): 567-72.
- Leong, X.F., Ng, C.Y., Jazrin, K. 2015. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *Biomed Res Int* 2015: 528757.
- McHroy, L.S., Wade, G.N. 1987. Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. *Physiol Behav* 39(5): 361-5.

- Nurul Iman, B.S., Kamisah, Y., Jaarin, K., Qudriyah, H.M. 2013. Virgin coconut oil prevents blood pressure elevation and improves endothelial functions in rats fed with repeatedly heated palm oil. *Food Based Complementary Alternative Med* 2013: 629329.
- Park, S.I., Yang, H.M., Seo, K.W., Choi, S.Y., Choi, B.J., Yoon, M.H., Hwang, G.S., Park, S.J., Sheen, S.S., Choi, B.J., Lim, H.S. 2016. The relationship between coronary atherosclerosis and body fat distribution measured using dual energy X-ray absorptiometry. *Atherosclerosis* 248: 190-5.
- Poirier, P., Giles, T.D., Bray, G.A., Hong, Y., Stern, J.S., Pi-Sunyer, F.X., Eckel, K.H. 2006. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(5): 968-76.
- Kyu, S.H., Kang, M.S., Kim, K.I., Kang, Y.H., Kang, J.S. 2012. Effects of green tea or *Sasa quepaertensis* bamboo leaves on plasma and liver lipids, erythrocyte Na efflux, and platelet aggregation in ovariectomized rats. *Nutr Res Pract* 6(2): 106-12.
- Shinoda, M., Lizaro, M.G., Laviole, J.M. 2002. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hypohestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(3): 335-43.
- World Health Organization (WHO). 1994. Scientific Group on Research on the Menopause in the 1990s. WHO Technical Report Series 866, Switzerland, Geneva.
- Yamakawa, T., Tanaka, S., Tamura, K., Ioda, F., Ukiwa, K., Yamakura, Y., Takahashi, Y., Kuchi, Y., Umemura, S., Ichi, M., Sekihara, H. 1995. Wistar fatty rat is obese and spontaneously hypertensive. *Hypertension* 25(1): 146-50.
- Zago, V., Sanguineti, S., Bihes, P., Berg, G., Vondra, J., Basilio, F., Wilinski, R., Schreier, P. 2004. Impaired high-density lipoprotein antioxidant activity in healthy postmenopausal women. *Atherosclerosis* 177(1): 203-210.