

**PENGENALPASTIAN ISOMER VITAMIN E YANG
PALING EFEKTIF MENGGUNAKAN SEL
OSTEOBLAS hFOB 1.19 PADA PERANCAH
TULANG HAIWAN**

NUR FARHANA BINTI MOHD FOZI

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

**PENGENALPASTIAN ISOMER VITAMIN E YANG PALING EFEKTIF
MENGUNAKAN SEL OSTEOLAS hFOB 1.19 PADA
PERANCAH TULANG HAIWAN**

NUR FARHANA BINTI MOHD FOZI

**TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH
SARJANA SAINS PERUBATAN (FARMAKOLOGI)**

**FAKULTI PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR**

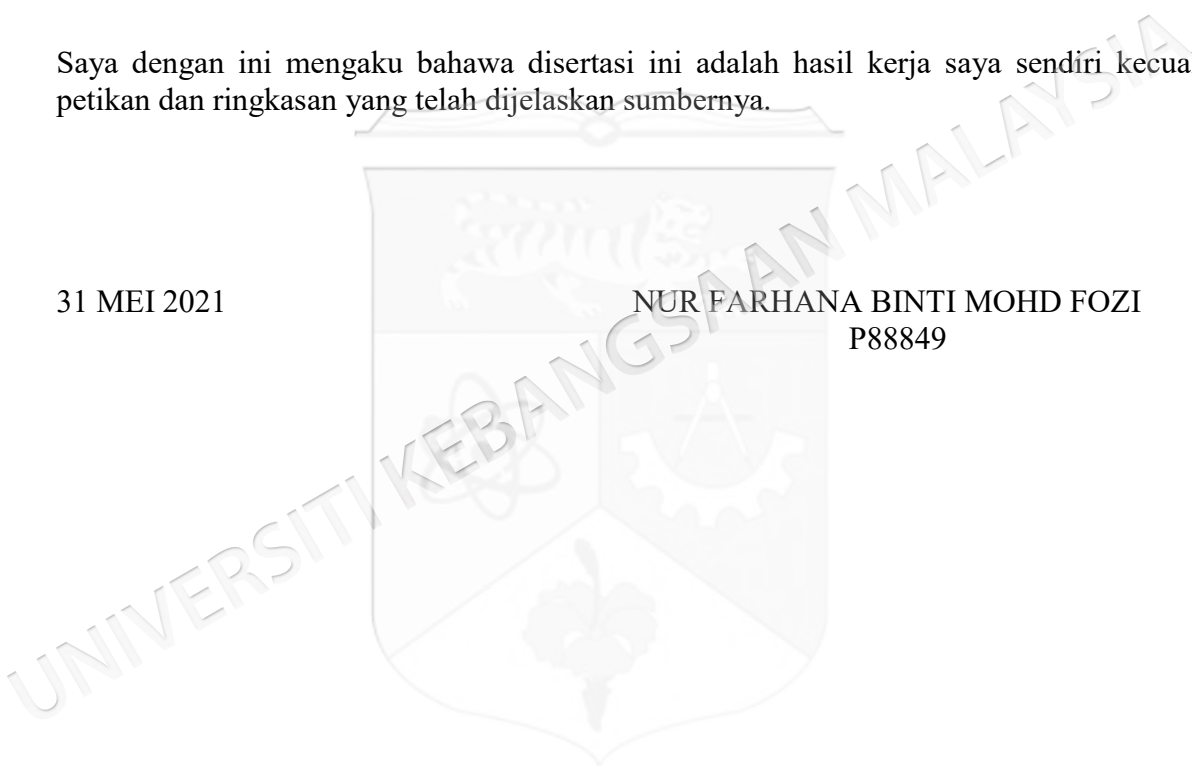
2021

PENGAKUAN

Saya dengan ini mengaku bahawa disertasi ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali petikan dan ringkasan yang telah dijelaskan sumbernya.

31 MEI 2021

NUR FARHANA BINTI MOHD FOZI
P88849



**PERAKUAN TESIS SARJANA / DOKTOR FALSAFAH
(CERTIFICATION OF MASTERS / DOCTORAL THESIS)**

Nama Penuh Pengarang
(Author's Full Name) : NUR FARHANA BINTI MOHD FOZI

No. Pendaftaran Pelajar
(Student's Registration No.) : P88849 Sesi Akademik
(Academic Session) : 1/2016-2017

Tajuk Tesis
(Thesis Title) : Pengenalpastian Isomer Vitamin E Yang Paling Efektif
Menggunakan Sel Osteoblas hFOB 1.19 Pada Perancah
Tulang Haiwan

Merujuk kepada Klausa 4.2 Dasar Harta Intelek Pelajar UKM (Tambahan), tesis adalah hak milik pelajar. Saya mengaku tesis ini sebagai:
(With regard to Clause 4.2 of the UKM Student Intellectual Property Policy (Supplementary), the thesis is the student's property. I hereby declare this thesis as:)

- ☐ **RAHSIA
(CONFIDENTIAL)** Mengandungi maklumat rahsia di bawah AKTA RAHSIA RASMI 1972
(Consisting of classified information under the OFFICIAL SECRETS ACT 1972)
- ☐ **TERHAD
(RESTRICTED)** Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan
(Consisting of RESTRICTED information which has been determined by the organisation/body where the research was conducted)
- ☒ **AKSES
TERBUKA
/TIDAK TERHAD
(OPEN ACCESS/
NON-
RESTRICTED)** Saya membenarkan tesis ini diterbitkan secara akses terbuka, teks penuh atau dibuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
(I allow this thesis to be published through open access, full text or copied for study, learning and research purposes only.)

Bagi kategori Akses Terbuka/Tidak Terhad, saya membenarkan tesis (Sarjana/Doktor Falsafah) ini disimpan di Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM)* dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

(For the Open Access/Non-Restricted category, I allow this (Master's/Doctoral) Thesis to be kept in the Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) Library with the following usage conditions:)

1. Perpustakaan UKM mempunyai hak untuk membuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
(UKM Library has the right to reproduce the thesis for study, learning and research purposes only.)
2. Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia dibenarkan membuat satu (1) salinan tesis ini untuk tujuan pertukaran antara institusi pengajian tinggi dan mana-mana badan/ agensi kerajaan, tertakluk kepada terma dan syarat.
(UKM Library is allowed to make one (1) copy of this thesis for exchange purpose among higher education institutions and any government body/agency, subject to terms and conditions.)



PROFESOR DR. IMA NIRWANA SOELAIMAN
No. Pendaftaran Pemah MPM: 28101
JBSB (UM), PhD (UKM)
Pakar Farmakologi
Jabatan Farmakologi
Pusat Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia

DISAHKAN OLEH:
(VERIFIED BY:)

TANDATANGAN PELAJAR
(STUDENT'S SIGNATURE)

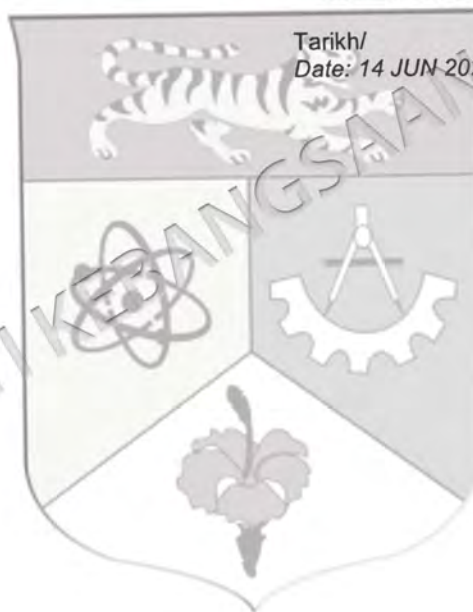
TANDATANGAN PENYELIA /
PENGURUSI JK SISWAZAH
(SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON
SUPERVISION COMMITTEE
SIGNATURE)

850409-11-5120
KAD PENGENALAN /
NO. PASPORT
(IDENTITY CARD/PASSPORT
NO.)

PROF. DR IMA NIRWANA SOELAIMAN
NAMA PENYELIA/
PENGURUSI JK SISWAZAH
(SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON
SUPERVISION COMMITTEE NAME)

Tarikh/
Date: 14 JUN 2021

Tarikh/
Date: 14 JUN 2021



PENGHARGAAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pengasih dan lagi Maha Penyayang. Selawat dan salam ke atas junjungan besar Nabi Muhammad S.A.W serta keluarga dan para sahabat baginda sekalian. Syukur Alhamdulillah ke hadrat Ilahi kerana dianugerahkan kesihatan yang cukup, masa dan kematangan fikiran untuk saya menyiapkan kajian ini dalam bentuk sebegini rupa.

Setinggi-tinggi penghargaan dan terima kasih kepada penyelia utama saya, Prof. Dr. Ima Nirwana Soelaiman di atas bantuan yang begitu besar, bimbingan, teguran dan nasihat yang berguna sepanjang kajian dan penulisan karya. Tidak lupa juga kepada penyelia bersama iaitu Prof. Madya Dr. Chua Kien Hui atas segala tunjuk ajar, teguran, bantuan teknikal dan idea yang bernas yang telah diberikan kepada saya. Tidak ketinggalan, ucapan terima kasih kepada Dr Chin Kok-yong yang sentiasa memberikan idea bernas dan kata semangat. Jutaan terima kepada Universiti Kebangsaan Malaysia yang telah menaja pengajian ini. Tidak ketinggalan adalah pihak American River Nutrition yang telah menyumbangkan isomer tokotrienol untuk kegunaan penyelidikan ini.

Saya juga ingin merakamkan ucapan terima kasih dan rasa terhutang budi kepada staf sokongan Jabatan Farmakologi, Fakulti Perubatan, UKM atas segala bantuan yang telah dihulurkan sepanjang saya menjalankan kajian ini. Selain itu, terima kasih yang tidak terhingga juga diucapkan kepada rakan-rakan seperjuangan yang sentiasa menghulurkan bantuan, sokongan moral serta kerjasama terutamanya, Haryati Mohd Hairi, Zil Hayatulina, James Jam Jolly yang sentiasa menemani saya dikala susah dan senang. Jasa baik kalian amat saya hargai kerana tanpa kalian adalah sukar untuk saya menyiapkan kajian ini.

Saya juga ingin merakam penghargaan dan terima kasih yang tidak terhingga kepada kedua ibu bapa dan ahli keluarga yang sentiasa diingati, kejayaan kajian ini adalah hadiah paling berharga buat kalian. Akhir kata, ucapan terima kasih ditujukan kepada semua individu yang membantu secara langsung atau tidak langsung dalam proses menyiapkan kajian dan karya ini.

ABSTRAK

Osteoporosis adalah penyakit yang dicirikan oleh jisim tulang yang rendah, kemerosoton tisu tulang dan gangguan struktur mikro tulang yang menyebabkan kekuatan tulang terjejas dan peningkatan risiko patah tulang. Kajian penyelidikan yang lepas mendapati bahawa vitamin E yang terkandung di dalam kelapa sawit berpotensi untuk membantu pembentukan tulang. Oleh itu, kajian ini direka bagi mengenalpasti kesan antiosteoporosis setiap isomer tokotrienol (α -, β -, γ - dan δ -) dan isomer α -tokoferol menggunakan sistem tiga dimensi statik pada tulang perancah lembu. Kajian ini terbahagi kepada dua peringkat iaitu penyediaan tulang perancah lembu dan pengenalan isomer vitamin E yang berpotensi dalam pembentukan semula tulang. Pada peringkat pertama tulang bahagian trabekular kepala femur lembu melalui proses nyahkalsium dan dipotong dalam ukuran 10 mm x 10 mm x 5 mm untuk dijadikan sebagai perancah tulang lembu. Sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 telah dirawat dengan kepekatan isomer vitamin E yang berbeza (1-1000 nM) dan dianalisis menggunakan asai sel viabiliti. Sel osteoblas yang dirawat dengan γ -tokotrienol dan δ -tokotrienol pada kepekatan 100 nM meningkatkan proliferasi sel berbanding kumpulan kawalan ($p < 0.05$). Sel osteoblas kemudian dibiakkan pada perancah tulang lembu dan dirawat dengan setiap individu isomer tokotrienol pada kepekatan 100 nM selama 21 hari di bawah keadaan piawai kultur (37°C , 95% kelembapan dan 5% kepekatan CO_2). Imbasan mikroskopi elektron menunjukkan pelekatan sel osteoblas pada tulang perancah. Pada kajian peringkat kedua, analisis biokimia serta histomorfometri dibuat. Aktiviti fosfatase alkali (ALP) telah meningkat dari hari ke 7 sehingga hari ke-15 selepas rawatan vitamin E isomer tokotrienol dan tokoferol ($p < 0.05$). Aktiviti ALP pada perancah yang dirawat dengan γ -tokotrienol meningkat lebih tinggi berbanding isomer lain pada setiap masa ($p < 0.05$). Aras osteokalsin meningkat bermula pada hari ke-7 pada rawatan isomer tokotrienol dan α -tokoferol. Kesemua kumpulan rawatan menunjukkan peningkatan yang signifikan berbanding kumpulan kawalan kecuali pada hari ke-21 ($p < 0.05$). Keputusan histomorfometri mendapati bahawa γ - dan δ - tokotrienol menunjukkan peningkatan pemulihan paling tinggi berbanding rawatan lain ($p < 0.05$). Imbasan tomografi berkomputer menunjukkan isomer γ -tokotrienol meningkatkan perimeter tulang, isipadu trabekular, ketebalan trabekular serta jumlah trabekular dengan signifikan ($p < 0.05$). Kesimpulannya, γ - dan δ -tokotrienol adalah isomer vitamin E yang paling berkesan untuk memperbaiki tulang yang telah dinyahkalsium. Kedua-dua isomer tokotrienol ini berpotensi digunakan sebagai rawatan antiosteoporosis.

IDENTIFICATION OF THE ACTIVE ISOMERS OF VITAMIN E USING OSTEOBLAST CELL hFOB 1.19 ON BOVINE BONE SCAFFOLD

ABSTRACT

Osteoporosis is a disease characterized by low bone mass, deterioration of bone tissue and disruption of the microarchitecture, which can lead to compromised bone strength and increased risk of fractures. Previous research has found that vitamin E contained in palm oil has the potential to aid bone formation. Therefore, this study was designed to identify the antiosteoporotic effects of each of the tocotrienols (α -, β -, γ -, and δ -) and α -tocopherol isomers using a static three-dimensional system using bovine bone as the scaffold. This study was divided into two stages: preparation of bovine bone scaffold and identification of vitamin E isomers that have the potential to improve bone formation. In the first stage, the trabecular part of the bovine femoral head was decalcified and cut into 10 mm x 10 mm x 5mm and used as the bovine bone scaffold. hFOB 1.19 human fetal osteoblast cells then were treated with different concentrations of vitamin E isomers (1-1000 nM) and analyzed using cell viability assays. Osteoblast cells treated with γ -tocotrienol and δ -tocotrienol at 100 nM increased the cell proliferation compared to the control group ($p < 0.05$). Osteoblast cells were cultured onto the bovine bone scaffold and treated with each individual tocotrienol isomer at 100 nM for 21 days under standard culture conditions (37°C, 95% humidity and 5% CO₂ concentration). Scanning electron microscopic showed adhesion of osteoblast cell into the bone scaffold. In the second phase study, biochemical and histomorphometric analysis were performed. The ALP activity increased from day 7 to day 15 after treatment with the tocotrienol isomers and α -tocopherol. The ALP activity was higher in the scaffold treated with γ -tocotrienol than other isomers at all-time points. Osteocalcein level began to increase on day 7 of the treatment with the tocotrienol isomers and alpha tocopherol. All treatment groups showed significant increase compared to control group except on day 21 ($p < 0.05$). The histomorphometric results of γ - and δ - tocotrienols showed the highest improvement compared to the other treatments ($p < 0.05$). Micro CT scanning showed that gamma tocotrienol significantly increased the bone perimeter, trabecular volume, trabecular thickness and trabecular number. In conclusion, γ -and δ -tocotrienol were the most effective vitamin E isomers for repairing decalcified bone. Both of these tocotrienol isomers are potentially useful as antiosteoporosis treatments.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	xii
SENARAI ILUSTRASI	xiv
SENARAI MIKROFOTGRAFI	xvi
SENARAI SIMBOL	xvii
SENARAI SINGKATAN	xviii
SENARAI TATANAMA	xx
 BAB 1 PENGENALAN	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Justifikasi Kajian	3
1.3 Objektif Umum	5
1.4 Objektif Spesifik	5
1.5 Hipotesis Kajian	5
1.6 Kepentingan Kajian	6
 BAB 2 KAJIAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Tulang	
2.1.1 Anatomi dan Fisiologi Tulang	7
2.1.2 Struktur Tulang	10
2.1.3 Komponen Selular Tulang	12
2.1.4 Pemodelan Tulang	14

2.1.5	Pemodelan Semula Tulang	15
2.1.6	Tempoh Kitaran Pembentukan Semula Tulang	18
2.2	Osteoporosis	
2.2.1	Osteoporosis dan Prevalens	18
2.2.2	Faktor Risiko Osteoporosis	20
2.2.3	Rawatan Osteoporosis: Terapi Bukan Farmakologi	21
2.2.4	Rawatan Osteoporosis: Terapi Farmakologi	22
2.3	Vitamin E	
2.3.1	Vitamin E	25
2.3.2	Tokotrienol dan Tokoferol	26
2.3.3	Peranan Tokotrienol Dalam Pembentukan Tulang	27
2.4	Pengkulturan Sel Tulang Secara <i>in Vitro</i>	
2.4.1	Pembentukan Semula Tulang Secara <i>in Vitro</i>	28
2.4.2	Penggunaan Perancah Tulang Sebagai Model Osteoporosis	30
2.4.3	Keperluan Dalam Penghasilan Perancah	31
2.5	Osteoblas Dan Model Perancah Tulang	32
2.6	Penanda Biokimia Dalam Pemodelan Semula Tulang	33
2.7	Kajian Kesan Isomer Vitamin E Pada Tulang	34

BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH

3.1	Bahan Kajian	
3.1.1	Graf Tulang	37
3.1.2	Rawatan Vitamin E	37
3.1.3	Sel Osteoblas	37
3.1.4	Plasma	38
3.2	Bahan Kimia dan Reagen	38
3.3	Penyediaan Media, Larutan Dan Rawatan	
3.3.1	Penyediaan Media Kultur Lengkap (CCM)	43

3.3.2	Penyediaan EDTA dan Larutan Formalin	
	Penimbal Neutral (PBS) 10%	43
3.3.3	Penyediaan Fibrin Daripada Serum	
	Penderma	43
3.4	Alat Radas	44
3.5	Peringkat Kajian	46
3.5.1	Peringkat Pertama: Pengkulturan Sel Osteoblas dan	
	Ujian Viabiliti	47
3.5.2	Peringkat Kedua: Penyediaan Perancah Tulang	
	Lembu dan Pengujian Perlekatan Sel Osteoblas	
	Pada Perancah	47
3.5.3	Peringkat Ketiga: Pengujian Kesan Rawatan	
	Isomer Vitamin E	48
3.6	Reka Bentuk Kajian	49
3.7	Kaedah Kajian	
3.7.1	Pensterilan Alat Radas	52
3.7.2	Penyediaan Perancah Tulang Lembu	52
3.7.3	Penyediaan Acuan 5% Gel Agarosa	54
3.7.4	Penyediaan Pengumpulan Fibrin	54
3.7.5	Pengkulturan Sel	54
3.7.6	Pengiraan Sel	56
3.7.7	Penyediaan Dan Rawatan Isomer Vitamin E	56
3.7.8	Pengukuran Asai Viabiliti Sel	57
3.7.9	Pengkulturan Sel Osteoblas Pada Perancah	
	Tulang Lembu	58
3.7.10	Pengimbasan Elektron Mikroskop Bagi	
	Perlekatan Sel Osteoblas Pada Perancah Tulang	
	Lembu	60
3.7.11	Pengukuran Asai Aktiviti Fosfatase Alkali	61
3.7.12	Pengukuran Asai Penentuan Osteokalsin	62
3.7.13	Ujian Histomorfometri Tulang Berstruktur Bagi	
	Sampel Tulang Tak Ternyakhkalsium	62

3.7.14	Pengukuran Histomorfometri Tulang Statik Bagi Tulang Nyahkalsium	66
3.7.15	Pengukuran Imbasan Tomografi Berkomputer (<i>Ct Scan</i>)	68
3.8	Analisis Statistik	69
BAB 4	HASIL	
4.1	Viabiliti Sel Bagi Pemilihan Kepekatan Rawatan Isomer Vitamin E	70
4.2	Imbasan Elektron Mikroskop	72
4.3	Asai Biokimia	
4.3.1	Asai Aktiviti Fosfatase Alkali	75
4.3.2	Osteokalsin	77
4.4	Histomorfometri Tulang	
A.	Histomorfometri Berstruktur Tulang	
4.4.1	Pewarnaan Von Kossa Histomorfometri Berstruktur	79
4.4.2	Isipadu Tulang Trabekular (BV/TV)	81
4.4.3	Ketebalan Trabekular (Tb. Th)	81
4.4.4	Bilangan Trabekular (Tb. N)	84
4.4.5	Jarak Pemisahan Trabekular (Tb. Sp)	84
B.	Histomorfometri Statik	
4.4.6	Histomorfometrik Statik (Pewarnaan Hematoxilin dan Eosin)	87
4.5	Parameter Imbasan Tomografi Berkomputer (<i>CT Scan</i>)	90
4.5.1	Peratus Keporosan Trabekular	92
4.5.2	Ketebalan Trabekular	92
4.5.3	Isipadu Tulang Trabekular (BV/TV)	95
4.5.4	Bilangan Trabekular (Tb.N)	97
4.5.5	Pemisahan Trabekular (Tb.Sp)	97

BAB V PERBINCANGAN

5.1	Pengkulturan Sel Osteoblas Dan Penyediaan Perancah Tulang	100
5.2	Keupayaan dan Kejayaan Sel Osteoblas Melekat Pada Perancah Tulang Melalui Imbasan Mikroskop Elektron	102
5.3	Penentuan aan Pemilihan Kepekatan Rawatan Isomer Vitamin E	104
5.4	Penanda Biokimia Bagi Rawatan Vitamin E ke Atas Perancah Tulang Lembu	105
5.5	Analisa Histomorfometri Struktur Perancah Tulang Lembu	107
5.6	Analisa Tomografi Berkomputer (<i>Micro CT Scan</i>)	111
5.7	Kesan Rawatan Vitamin E Dalam Membantu Pembentukan Semula Tulang	113

BAB VI RUMUSAN

6.1	Kesimpulan	117
6.2	Limitasi Kajian	118
6.3	Cadangan	118

RUJUKAN	120
----------------	-----

LAMPIRAN

Lampiran A	Artikel Yang Telah Diterbitkan	134
Lampiran B	Abstrak Dalam Persidangan	138
Lampiran C	Protokol Kit	147

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
Jadual 2.1	Faktor Kekuatan Tulang	20
Jadual 2.2	Faktor Risiko Utama Osteoporosis	20
Jadual 2.3	Faktor Risiko Sekunder Osteoporosis	21
Jadual 3.1	Ciri-Ciri Sel Osteoblas Fetus Manusia hFOB 1.19 Serta Keperluan Pertumbuhan Sel	38
Jadual 3.2	Senarai Bahan Kimia Penyediaan Perancah Tulang Lembu	38
Jadual 3.3	Senarai Bahan Kimia Pengkulturan Sel Osteoblas Fetus Manusia Hfob 1.19	39
Jadual 3.4	Senarai Bahan Kimia Pengiraan Sel	39
Jadual 3.5	Senarai Bahan Kimia Penyediaan Gel Agarosa	39
Jadual 3.6	Senarai Bahan Kimia Viabiliti Sel	40
Jadual 3.7	Senarai Bahan Kimia Bagi Penyediaan Tulang Tak Ternyalkalsium	40
Jadual 3.8	Senarai Bahan Kimia Perwarnaan von Kossa	41
Jadual 3.9	Senarai Bahan Kimia Penyediaan Tulang Nyahkalsium	41
Jadual 3.10	Senarai Bahan Kimia Hematoxilin Dan Eosin	42
Jadual 3.11	Senarai Bahan Kimia Kit Penanda Biokimia	42
Jadual 3.12	Senarai Bahan Kimia Pengimbasan Mikroskop Elektron	42

Jadual 3.13	Jadual Pembahagian Kumpulan Rawatan Perancah Tulang Lembu	48
Jadual 3.14	Senarai Bahan Kimia Yang Terdapat Di Dalam Kit Aktiviti ALP	61
Jadual 3.15	Bahan Yang Terdapat Di Dalam Kit Asai Osteokalsin	62
Jadual 4.1	Jadual Pembahagian Kumpulan Rawatan Bagi Ujian Viabiliti Sel	70
Jadual 4.2	Jadual Pembahagian Kumpulan Rawatan Perancah Tulang Lembu	73



SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
Rajah 2.1	Anatomi tulang panjang	9
Rajah 2.2	Struktur tulang kortikal	10
Rajah 2.3	Struktur tulang trabekular	11
Rajah 2.4	Strategi aturan sel osteoblas dan sel osteoklas	14
Rajah 2.5	Proses pemodelan semula tulang	16
Rajah 2.6	Struktur isomer-isomer tokoferol dan tokotrienol	26
Rajah 2.7	Kelebihan pengkulturan secara 3 dimensi berbanding 2 dimensi	30
Rajah 2.8	Ringkasan keperluan perancah	32
Rajah 3.1	Gambaran peringkat kajian kesan isomer vitamin E secara <i>in vitro</i>	47
Rajah 3.2	Penentuan kepekatan rawatan isomer vitamin E terhadap sel osteoblas, hFOB 1.19	49
Rajah 3.3	Reka bentuk kajian	51
Rajah 3.4	Proses penyediaan perancah tulang	53
Rajah 3.5	Pengkulturan sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 pada perancah tulang lembu	59
Rajah 3.6	Proses pengkulturan sel osteoblas pada perancah tulang lembu dan diuji untuk melihat perlekatan sel di dalam perancah	60

Rajah 4.1	Viabiliti sel selepas rawatan isomer vitamin E yang berbeza kepekatan tokotrienol dan α - tokoferol (1, 10,100 dan 1000 nM) dibandingkan dengan kumpulan kawalan.	71
Rajah 4.2	Aktiviti ALP selepas rawatan dengan isomer vitamin E selama 3, 7 dan 15 hari	76
Rajah 4.3	Graf perbandingan osteokalsin bagi perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer Vitamin E	78
Rajah 4.4	Peratus isipadu tulang trabekular (BV/TV) bagi semua kumpulan rawatan	82
Rajah 4.5	Graf perbandingan ketebalan trabekular antara semua kumplan rawatan isomer vitamin E	83
Rajah 4.6	Graf perbandingan biangan trabekular dengan kumpulan rawatan isomer vitamin E	85
Rajah 4.7	Graf perbandingan nilai purata jarak pemisahan trabekular bagi semua kumpulan rawatan	86
Rajah 4.8	Graf perbandingan keporosan setiap rawatan isomer vitamin E	93
Rajah 4.9	Graf perbandingan ketebalan trabekular rawatan isomer vitamin E	94
Rajah 4.10	Peratusan Isipadu tulang/isipadu trabekular setiap rawatan isomer vitamin E	96
Rajah 4.11	Graf perbandingan bilangan trabekular bagi rawatan isomer vitamin E	98
Rajah 4.12	Graf jarak pemisahan trabekular bagi rawatan isomer vitamin E	99
Rajah 5.1	Ringkasan kesan rawatan isomer vitamin E pada perancah tulang lembu	116
Rajah 5.2	Urutan rawatan isomer vitamin E yang paling efektif	116

SENARAI MIKROFOTOGRAF

No. Mikrofotograf		Halaman
Mikrofotograf 4.1	Mikrofotograf permukaan tulang perancah osteoporotik (OB) menunjukkan saiz keporosan yang berbeza	73
Mikrofotograf 4.2	Mikrofotograf daripada mikroskop elektron pada permukaan perancah lembu yang telah dirawat dengan isomer vitamin E	74
Mikrofotograf 4.3	Mikrofotograf menunjukkan keratan rentas tulang perancah yang telah diberi rawatan isomer vitamin E dan diwarnakan dengan perwarnaan von Kossa.	80
Mikrofotograf 4.4	Mikrofotograf Pewarnaan Hematoxilin dan eosin pada perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E. Tanda panah hitam menunjukkan kawasan trabekular	88
Mikrofotograf 4.5	Pewarnaan hematoxilin dan eosin pada perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E.	89
Miktofotograf 4.6	Mikrofotograf menunjukkan imej 3D daripada analisis gambaran tomografi berkomputer bagi perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E	91

SENARAI SIMBOL

μg	Mikrogram
g	Gram
μl	Mikroliter
ml	Mililiter
mg	Miligram
mm	Milimeter
nM	Nanomolar
rpm	Pusingan per minit (<i>round per minute</i>)
g	Graviti
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
$\%$	Peratus
$<$	Kurang daripada
α	Alfa (<i>alpha</i>)
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta

SENARAI SINGKATAN

AnTT	Tokotrienol annatto
COL1 α 1	Kolagen 1 alfa 1
ALP	Fosfatase Alkali
OCN	Osteokalsin
HMGR	HMG-CoA reduktase
BMP	Protein morfogenetik tulang
TRAP	Asid fosfatase rintang tartrat (<i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>)
CATK	Katepsin K
FPP	Farnesil pirofosfat
DMEMF12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
MTS	3-(4,4-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
SEM	<i>Standard error mean</i> (min ralat piawai)
FBS	Serum fetus lembu
PBS	Larutan penimbil sulfat salin
RANKL	Reseptor pengaktif nuclear ligan kappa-B
OPG	Osteoprotegerin
BP	Bisfosfonat
HDL	Lipoprotein ketumpatan tinggi
LDL	Lipoprotein ketumpatan rendah
ER	Reseptor estrogen
IL	Interleukin
TNF- α	Faktor nekrosis tumor alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)

EDTA	Asid ethilenediaminetetraasetik
USD	Dolar Amerika
TT	Tokotrienol
DMSO	Dimetil sulfoksida
PC	Kawalan positif (Perancah tulang asli @ <i>native</i>)
NC	Kawalan negatif (Perancah tulang nyahkalsium yang disuntik sel osteoblas diletakkan ke dalam media lengkap)
OB	Tulang osteoporotik (perancah tulang yang nyahkalsium tanpa media)
AP	Perancah tulang NC yang dirawat dengan 100 nM α -tokoferol
AT	Perancah tulang NC yang dirawat dengan 100 nM α -tokotrienol
BT	Perancah tulang NC yang dirawat dengan 100 nM β -tokotrienol
GT	Perancah tulang NC yang dirawat dengan 100 nM γ -tokotrienol
DT	Perancah tulang NC yang dirawat dengan 100 nM δ -tokotrienol

SENARAI TATANAMA

Ca(OH)_2	Kalsium hidroksida
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Kristal hidroksiapatit
CaCO_3	Kalsium karbonat
H_2O	Molekul air
CO_2	Gas karbon dioksida
P_i	Fosfat tak organik
H_2SO_4	Asid sulfurik
AgNO_3	Argentum nitrat (<i>silver nitrate</i>)
NaOH	Natrium hidroksida

BAB I

PENGENALAN

1.1 PENGENALAN

Osteoporosis adalah satu keadaan di mana berlaku penurunan ketumpatan tulang yang menyebabkan kerapuhan tulang. Osteoporosis adalah penyakit yang biasanya dihadapi oleh warga tua. Masalah osteoporosis dan keretakan tulang sering menimpa wanita terutamanya warga tua. Kecederaan boleh berlaku apabila warga tua tergelincir atau terjatuh daripada kerusi dan sebagainya. Osteoporosis sering dikenali sebagai penyakit senyap kerana pada peringkat awal kehilangan tulang berlaku tanpa menunjukkan gejala. Pesakit mungkin tidak menyedari mereka mengalami masalah osteoporosis sehinggalah tulang mereka menjadi sangat lemah di mana mudah patah atau sakit belakang yang teruk.

Tulang yang sihat memerlukan pembentukan semula berterusan untuk memelihara kepadatan tulang. Proses pembentukan semula tulang merupakan proses dinamik yang melibatkan keseimbangan dalam proses pembentukan tulang dan resorpsi tulang yang mana akan berlaku secara berterusan. Pada peringkat kanak-kanak, proses pembentukan tulang berjaya mendominasi proses keseimbangan tulang seiring dengan proses tumbesaran. Namun begitu setelah meningkat usia, proses pembentukan tulang akan mengalami kemerosoton. Kajian terdahulu membuktikan bahawa kekurangan paras estrogen merupakan permulaan awal episod menopause yang akhirnya boleh menyebabkan penurunan jisim tulang dalam kalangan wanita (Warren et al. 2015).

Vitamin E adalah vitamin larut lemak dengan kebolehan untuk memutuskan rantai radikal bebas. Vitamin E secara semulajadinya mempunyai lapan isomer yang berbeza dan dibahagikan kepada tokoferol dan tokotrienol. Isomer tersebut dibahagikan kepada alfa- (α -), beta- β -, delta- (δ -) tokoferol serta alfa- (α -), beta- β -, delta- (δ -) tokotrienol. Tokotrienol mempunyai kebolehan antioksidan yang lebih baik berbanding tokoferol (Serbinova et al. 1991). Vitamin E dipercayai boleh melindungi tulang kerana ciri antioksidanya yang meneutralkan radikal bebas dan memusnahkan peroksidasi lipid dan seterusnya menghalang pembentukan tekanan oksidatif. Vitamin E boleh ditemui dalam sumber semulajadi termasuk barli, gandum, dedak padi dan minyak kelapa sawit (Aggarwal et al 2010). Minyak kelapa sawit merupakan sumber utama tokotrienol dan mempunyai sejarah yang panjang serta penggunaan yang selamat kepada manusia (Sen et al. 2010)

Kajian yang dibuat oleh Shuid dan rakan-rakan menunjukkan bahawa rawatan γ -tokotrienol daripada sumber kelapa sawit meningkatkan struktur tulang, serta parameter selular dan dinamik pada tikus jantan yang normal (Shuid et al. 2010). γ -tokotrienol juga menunjukkan kekuatan tulang yang lebih baik berbanding tikus yang dirawat dengan α -tokoferol (Shuid et al. 2010). Tokotrienol mampu menghalang kerosakan mikrostruktur skeletal, meningkatkan kekuatan dan ketumpatan mineral serta kandungan kalsium (Chin et al. 2017). Kajian *in vitro* yang di buat oleh Xu menunjukkan bahawa rawatan γ -tokotrienol pada kepekatan 2-8 $\mu\text{mol/L}$ boleh membantu proliferasi, pembezaan dan mineralisasi tulang oleh sel selanjara pra-osteoblas, MC3T3-E1 (Xu et al. 2018)

Perancah adalah matriks sementara untuk pertumbuhan tulang dan menyediakan persekitaran dan seni bina khusus untuk pembangunan tisu. Perancah tulang bertindak sebagai templat bagi meniru fungsi matriks ekstraselular tulang. Secara asasnya tulang perancah yang dihasilkan perlulah menyokong pertumbuhan dan pembezaan selular. Bagi menghasilkan perancah tulang yang ideal, tulang perlulah mempunyai keporosan yang tinggi bagi membenarkan penyebaran dan pengangkutan nutrien, gas serta bahan buangan lain (LeGeroz et al. 1995). Hasil kajian lepas membuktikan bahawa saiz porositi yang sesuai adalah dianggarkan saiz 200 - 400 micron (Leong et al. 2003; Boyan et al. 1996). Dalam satu kajian yang lain mencadangkan saiz keporosan perancah adalah sehingga 500 micron (Yoshikawa et al. 1996).

1.2 JUSTIFIKASI KAJIAN

Statistik WHO menunjukkan bahawa minimum umur menopause secara semulajadinya adalah pada usia 51 tahun di negara maju manakala bagi negara dalam golongan miskin yang bukan industri adalah pada usia 48 tahun (Sapre & Thakur 2014). Dengan peningkatan kadar penuaan dalam kalangan penduduk dunia, osteoporosis menjadi masalah kesihatan awam yang penting. Isu osteoporosis akan menjadi beban ekonomi yang besar terhadap sumber perkhidmatan kesihatan awam. Menurut kajian yang dibuat oleh Strom pada tahun 2011, osteoporosis telah menjejaskan satu per tiga wanita setelah menopause, dan satu per lima lelaki yang berumur 50 tahun, bersamaan dengan 200 juta wanita dan lelaki di dunia (Strom et al. 2011).

Pada masa kini, rawatan yang digunakan untuk merawat osteoporosis banyak memberi tumpuan bagi menghalang resorpsi berlebihan sama ada menurunkan bilang sel osteoklas atau merencatkan aktiviti sel osteoklas. Teriparatida, agen anabolik merupakan satu-satunya rawatan yang dibenarkan dan digunakan bagi membantu pembentukan tulang yang baru (Lindsay et al. 2016). Namun begitu penggunaan rawatan tersebut memberi kesan sampingan seperti kerengsaan serta gangguan pada saluran pencernaan yang menghadkan penggunaan rawatan ini (Abdel-Naim et al. 2018). Sehubungan itu, rawatan daripada sumber semulajadi menjadi perhatian para penyelidik sebagai sumber dalam memberi rawatan kepada masalah osteoporosis bagi mengatasi kesan sampingan terapi konvensional (Tatatabaei-Malaxy et al. 2015). Penemuan oleh Thu dan rakan-rakan menunjukkan rawatan *Eurycoma longifolia* atau tongkat ali membantu proliferasi sel serta menggalakkan perkembangan sel (Thu et al. 2017).

Kebelakangan ini, penyelidikan terhadap vitamin E telah mendapat perhatian. Kajian pra-klinikal menunjukkan bahawa campuran isomer vitamin E yang mengandungi jumlah tokotrienol yang banyak mampu mencegah dan menghalang osteoporosis yang disebabkan oleh kekurangan estrogen, kekurangan testosteron, berlebihan glukocorticoid atau pendedahan kepada nikotin (Ahmad et al. 2005; Ima-Nirwana et al. 2005; Norazlina et al. 2007). Kajian yang dibuat oleh Abukhadir et al., pada 2012 melaporkan vitamin E daripada kelapa sawit membantu pembezaan sel osteoblas dan ekspresi gen untuk pembentukan semula tulang pada tikus yang diaruhkan nikotin. Kajian yang dibuat

oleh Wong et al., pada 2018 menunjukkan vitamin E membantu kesihatan tulang dengan merendahkan aras leptin dan meningkatkan aktiviti pembentukan semula tulang pada tikus Wistar jantan (Wong et al. 2018)

Pada tahun 2015, United Kingdom telah mencatatkan rekod sebanyak 2.08 juta prosedur eksperimen terhadap haiwan untuk tujuan penyelidikan. Di mana 89% prosedur telah dibuat ke atas tikus dan mencit. Tikus sering mendapat perhatian dan menjadi pilihan kerana melibatkan kos yang agak rendah (Boucci & Ballanti 2013) serta kesesuaian tikus untuk dipadankan dengan peralatan invasif seperti tomografi berkomputer (Linden et al. 2006). Walau bagaimanapun, penggunaan haiwan tidak dapat mewakili fisiologi dan anatomi manusia yang tepat. Ia tidak mampu memberikan terjemahan yang sebenar bagi ujian di peringkat pra-klinikal dan klinikal (Benam et al. 2015; Mcgonigle & Ruggeri 2013). Tambahan lagi, penggunaan haiwan untuk eksperimen menimbulkan tentangan daripada organisasi-organisasi pencinta haiwan. Oleh kerana kekangan ini dalam kajian *in vivo*, maka kajian secara *in vitro* giat dilakukan. Beberapa model kajian *in vitro* telah dibangunkan sama ada secara dua dimensi atau tiga dimensi sebagai usaha mengkaji proses pembentukan semula tulang menggunakan perancah hidrogel (Jeon et al 2015; Bersini et al 2016) seramik (Sinclair et al 2011) atau pun komposit (Rao et al 2014; Heinemann et al 2013). Justeru itu, terdapat keperluan dalam membangunkan model yang boleh meniru keadaan mikro sekitaran tulang bagi mengkaji proses pembentukan semula tulang. Model sebegini perlu untuk membangunkan bahan-bahan baru untuk rawatan osteoporosis. Dalam kajian ini perancah tulang dijadikan templat bagi meniru keadaan sebenar perkembangan mikro sekitaran tulang secara tabung uji. Kajian terdahulu yang dibuat oleh kumpulan penyelidikan Li membangunkan perancah tulang daripada tulang lembu sebagai platform untuk penyampaian protein yang berkesan bagi menguji kesan biokompatiliti perancah (Li et al. 2015).

1.3 OBJEKTIF UMUM

Kajian ini bertujuan untuk menentukan kesan isomer α -, β -, γ -, δ -tokotrienol serta α -tokoferol ke atas fungsi pembentukan tulang dengan menggunakan perancah tulang lembu.

1.4 OBJEKTIF SPESIFIK

- a. Untuk mereka bentuk tulang lembu sebagai perancah untuk mengkaji kesan isomer vitamin E ke atas sel osteoblas fetus manusia, hFOB 1.19.
- b. Untuk mengenalpasti pertumbuhan dan perkembangan sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 yang dikultur pada perancah tulang lembu.
- c. Untuk mengenalpasti kesan anabolik isomer tokotrienol dalam meningkatkan struktur tulang serta kadar pembentukan tulang menggunakan perancah tulang lembu.
- d. Untuk mengesahkan isomer yang paling berkesan (α -, β -, δ -, γ -tokotrienol atau α -tokoferol) yang dapat memperbaiki struktur dan mineralisasi tulang menggunakan perancah tulang lembu.

1.5 HIPOTESIS KAJIAN

- a. Tulang lembu ialah perancah yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangan sel fetus manusia hFOB 1.19.
- b. Sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 mampu hidup dan berkembang setelah dikultur pada perancah tulang lembu
- c. Pengkulturan secara tiga dimensi oleh sel osteoblas fetus manusia, hFOB 1.19 pada perancah tulang lembu adalah sesuai untuk melihat kesan anabolik isomer-isomer vitamin E.

- d. Isomer-isomer yang paling berkesan adalah γ - dan δ -tokotrienol dalam memperbaiki struktur dan mineralisasi perancah tulang lembu.

1.6 KEPENTINGAN KAJIAN

Kajian ini bertujuan untuk membuktikan bahawa isomer vitamin E mempunyai kesan anti-osteoporosis dengan meningkatkan dan mempercepatkan pembentukan tulang serta memperbaiki struktur mikro tulang. Keputusan yang diperolehi pada akhir kajian diharapkan dapat membantu penyelidikan dalam mengenalpasti isomer yang paling efektif untuk rawatan osteoporosis. Kajian ini juga bertujuan untuk mereka bentuk model perancah yang diperbuat daripada tulang lembu untuk kegunaan kajian pada masa akan datang. Dengan adanya model ini, penggunaan haiwan makmal dapat diminimalkan. Model tiga dimensi ini mempunyai kelebihan berbanding kultur dua dimensi yang mana kesan sesuatu bahan yang diuji dapat dilihat terus ke atas tulang, di samping membolehkan mikro-manipulasi sistem untuk kajian mekanistik.

BAB II

KAJIAN KEPUSTAKAAN

2.1 TULANG

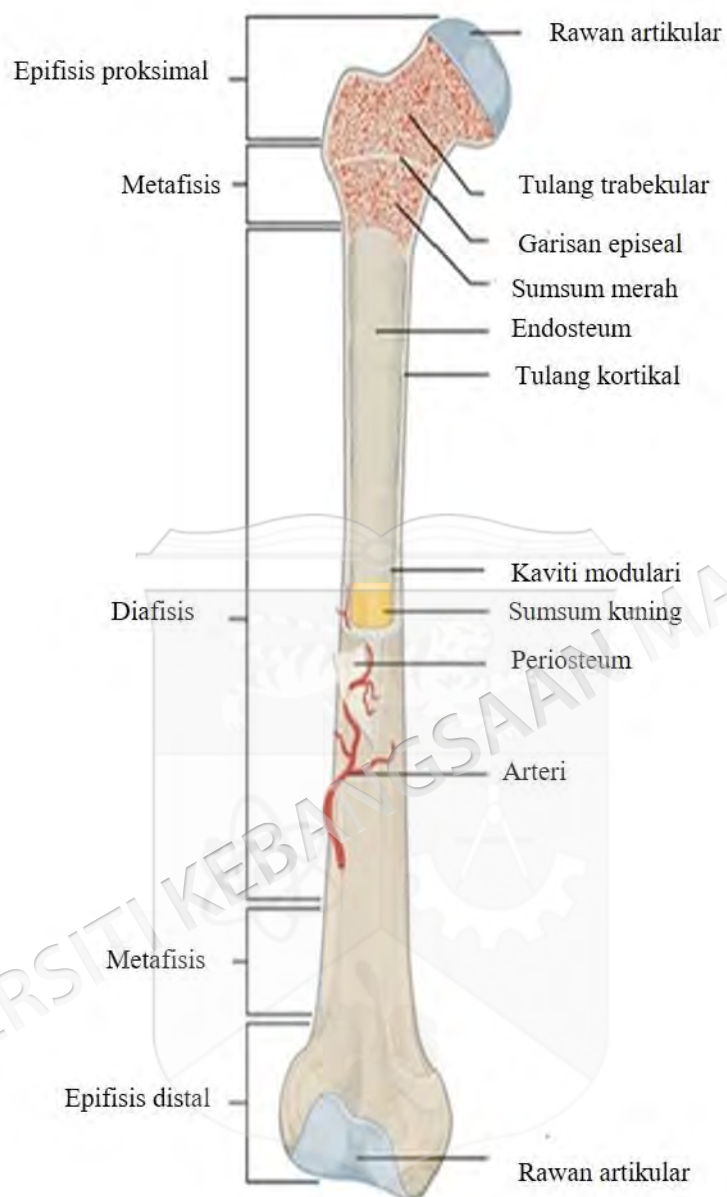
2.1.1 Anatomi dan Fisiologi Tulang

Tulang merupakan tisu yang paling kuat di dalam badan manusia. Tulang adalah tisu penghubung yang memberikan sokong struktur untuk pergerakan rangka, melindungi organ dalaman dan menjalankan homeostasis mineral kalsium dan fosfat (Barerre et al. 2006). Tulang adalah organ terbesar dalam tubuh badan manusia yang memberi struktur kepada tubuh badan dengan menyokong ligamen dan memberi perlekatan tendon untuk otot skeletal (Bartl et al. 2017). Tulang berperanan dalam memberi perlindungan kepada banyak organ dalaman badan daripada sebarang kecederaan. Contohnya tulang rusuk yang melindungi paru-paru.

Tulang bertindak sebagai tuas bagi menghasilkan pergerakan pada sendi. Tulang akan membantu pergerakan di mana otot skeletal yang berhubung mengalami kontraksi dan tulang akan bergerak untuk membuat pergerakan. Tulang merupakan tempat pembentukan darah dan hematopoiesis (Saravana & Ramasamy. 2017). Sum-sum tulang merah merupakan bahagian tengah tulang yang berfungsi menghasilkan sel darah merah dan membawa oksigen dan nutrien ke seluruh badan. Dalam proses penuaan, jumlah sum-sum tulang berkurangan dan menyebabkan penghasilan sel darah merah juga berkurangan. Jadi ini akan memberi kesan kepada daya tahan tubuh terhadap penyakit. Tulang menjadi tempat penyimpanan mineral terutamanya kalsium dan fosfat yang menyumbang kepada kekuatan tulang (Barerre et al. 2006).

Tulang terdiri daripada pelbagai saiz dan bentuk. Tulang manusia dewasa mengandungi sejumlah 206 tulang utama (Martin & Barholomew.2017). Tulang boleh diklasifikasikan kepada lima jenis. Tulang pertama adalah tulang rata. Tulang ini boleh dijumpai pada bahagian tengkorak. Fungsi tulang rata adalah melindungi organ dalaman. Tulang kedua adalah tulang panjang yang berfungsi untuk menanggung beban dan mengawal pergerakan. Tulang panjang biasanya terletak di kerangka appendikular dan merangkumi tulang di bahagian pinggul ke bawah seperti tibia dan femur. Tulang pendek ditemui di kawasan pergelangan tangan. Tulang pendek berfungsi mengawal pergerakan dan mengekalkan kestabilan badan. Tulang tidak teratur adalah tulang yang pelbagai bentuk dan struktur (Saravana & Ramasamy 2017). Tulang ini dijumpai di bahagian tulang belakang. Tulang tidak teratur berfungsi melindungi organ dalaman. Tulang tidak teratur pada bahagian pelvis membantu untuk melindungi organ pada bahagian kavitasi pelvis. Tulang sesamoid adalah tulang yang tertanam dalam tendon. Tulang ini bersaiz kecil dan bulat berada pada tendon tangan, lutut serta kaki. Tulang sesamoid berfungsi melindungi tendon daripada tekanan dan tergelincir. Contoh tulang sesamoid adalah patella ataupun tempurung lutut.

Struktur tulang panjang terbahagi kepada tiga bahagian iaitu i) epifisis, ii) metafisis, dan iii) diafisis (Saravana & Ramasamy 2017) (Rajah 2.1). Kawasan berongga diafisis dikenali sebagai kaviti medula dipenuhi dengan sum-sum kuning. Dinding diafisis terdiri daripada tulang kortikal yang padat dan keras. Bahagian yang lebih luas pada setiap hujung tulang dikenali sebagai epifisis. Tulang trabekular serta sum-sum merah akan memenuhi kawasan tersebut (Rajah 2.1). Pada kawasan kaviti medula terdapat lapisan membran yang dikenali sebagai endosteum. Di dalam endosteum berlakunya pertumbuhan dan pembentukan semula tulang. Permukaan luar tulang diselaputi dengan membran berserat yang disebut sebagai periosteum. Periosteum mengandungi saluran darah, saraf dan saluran limfa yang menyuburkan tulang padat. Epifisis akan ditutup dengan tulang rawan artikular bagi mengurangkan geseran dan bertindak menyerap hentaman (Zimmeemann et al. 2016).



Rajah 2.1 Anatomi tulang panjang

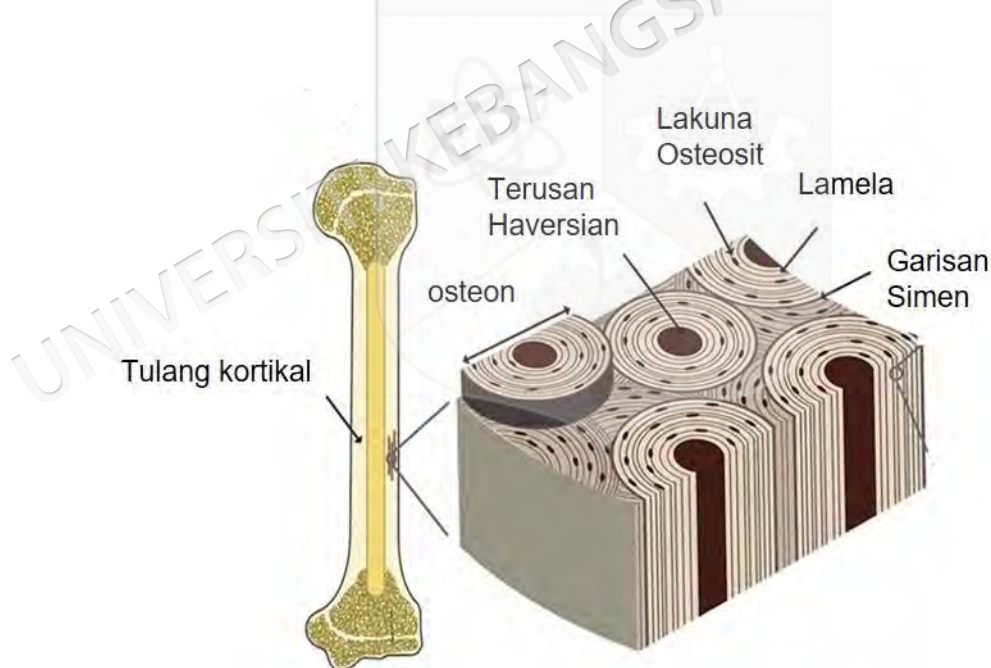
Sumber: Ubahsuai daripada Martin & Barholomew

2.1.2 Struktur Tulang

Secara mikroskopik, tulang terbahagi kepada dua iaitu tulang kortikal serta trabekular

a. Tulang Kortikal

Tulang kortikal adalah bahagian tulang keras yang memberi perlindungan kuat serta menutupi rongga sum-sum (Rajah 2.2). Tulang kortikal menyumbang hampir 80% berat individu dewasa. Tulang kortikal lebih padat serta padu dan berfungsi dalam memberi sokongan keseluruhan anggota badan. Tulang kortikal berfungsi melindungi organ dan mengawal pergerakan dan menjadi tempat simpanan kalsium. Saluran vaskular menempati 30% kawasan tulang kortikal. Nisbah permukaan dan isipadu tulang kortikal adalah lebih rendah daripada tulang trabekular. Seiring dengan peningkatan usia atau penyakit, tulang kortikal akan menjadi lebih berliang (poros) dan menyebabkan kehilangan kekuatan (Zimmeemann et al. 2016).

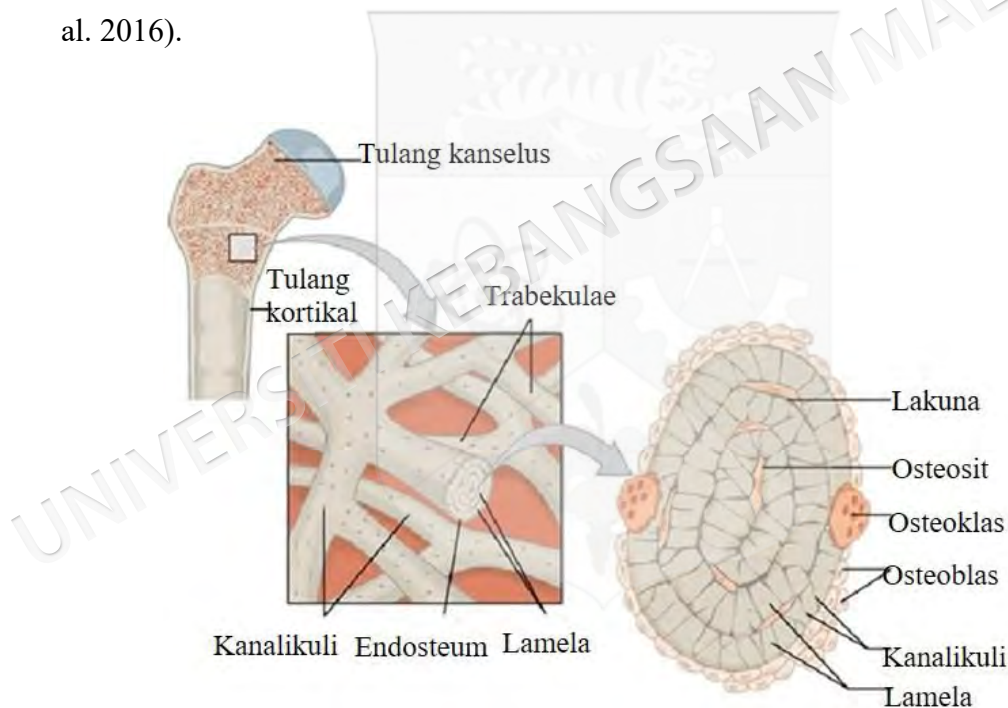


Rajah 2.2 Struktur tulang kortikal

Sumber: Ubahsuai daripada Zimmeemann et al. 2016

b. Tulang Trabekular

Tulang trabekular juga dikenali sebagai tulang kanselus. Tulang trabekular adalah tulang yang berpori dan kelihatan seperti sarang lebah (Rajah 2.3). Tulang trabekular berfungsi sebagai penahan dalam mengurangkan risiko kepatahan tulang (Tortoro & Derrickson 2009). Pada tulang trabekular terdapat sel osteoblas, sel osteosit, sel osteoklas, osteoid, sum-sum tulang, rawan, mineral tidak organik, membran, saraf serta salur darah. Tulang trabekular boleh didapati pada hujung tulang panjang berhampiran dengan sendi. Tulang trabekular mempunyai permukaan yang lebih besar dan mengandungi lebih banyak saluran darah. Di dalam tulang trabekular juga mengandungi sum-sum tulang bagi proses hematopoiesis berlaku. Tulang trabekular mempunyai kandungan kalsium yang lebih rendah dan kandungan air yang lebih tinggi berbanding tulang kortikal (Zimmeemann et al. 2016).



Rajah 2.3 Struktur tulang trabekular
Sumber: Ubahsuai Bart et al.2017

2.1.3 Komponen Selular Tulang

Tulang mengandung tiga jenis sel di mana dikategorikan kepada sel osteoblas, sel osteosit dan sel osteoklas. Keseimbangan homeostasis tulang osteoblas, osteosit serta osteoklas berlaku sewaktu pembentukan tulang (Rodan 1998)

a. Sel Osteoblas

Sel osteoblas terbentuk daripada sel stem mesenkima (MSCs) dan berbentuk kuboidal yang berfungsi untuk pembentukan matriks ekstraselular serta mineralisasi tulang. Sel osteoblas matang merembeskan protein tertentu yang membentuk struktur matrik tulang seperti kolagen jenis I (20%), osteokalsin dan osteonektin (40-50%), osteopontin, sialoprotein dan fibronectin (Manolagas 2000). Sel pra-osteoblas akan membeza dan melalui tiga peringkat di mana setiap peringkat akan dicirikan dengan penanda biokimia yang spesifik. Pada peringkat pertama, sel pra-osteoblas akan aktif berproliferasi dan merembeskan fibronectin, kolagen dan osteopontin. Seterusnya pada peringkat kedua, sel pra-osteoblas akan berhenti berproliferasi dan mula membeza. Pada peringkat ini sel pra-osteoblas dengan aktifnya merembeskan enzim fosfatase alkali serta kolagen Jenis I. Pada peringkat ketiga, proses pemineralan matriks akan berlaku dengan diaktifkan oleh osteokalsin bagi menggalakkan pemendakan mineral di permukaan tulang. Sel osteoblas matang yang aktif mensintesis tulang matriks berbentuk kuboid dan mempunyai nukleus, struktur golgi dan retikulum endoplasmik yang besar. Sel osteoblas yang terperangkap di dalam tulang akan membeza menjadi sel osteosit. Sel osteoblas yang terperangkap di dalam matrik tulang akan menjadi sel lapisan tulang atau mengalami apoptosis (Niedźwiedzki & Filipowska 2015).

b. Sel Osteosit

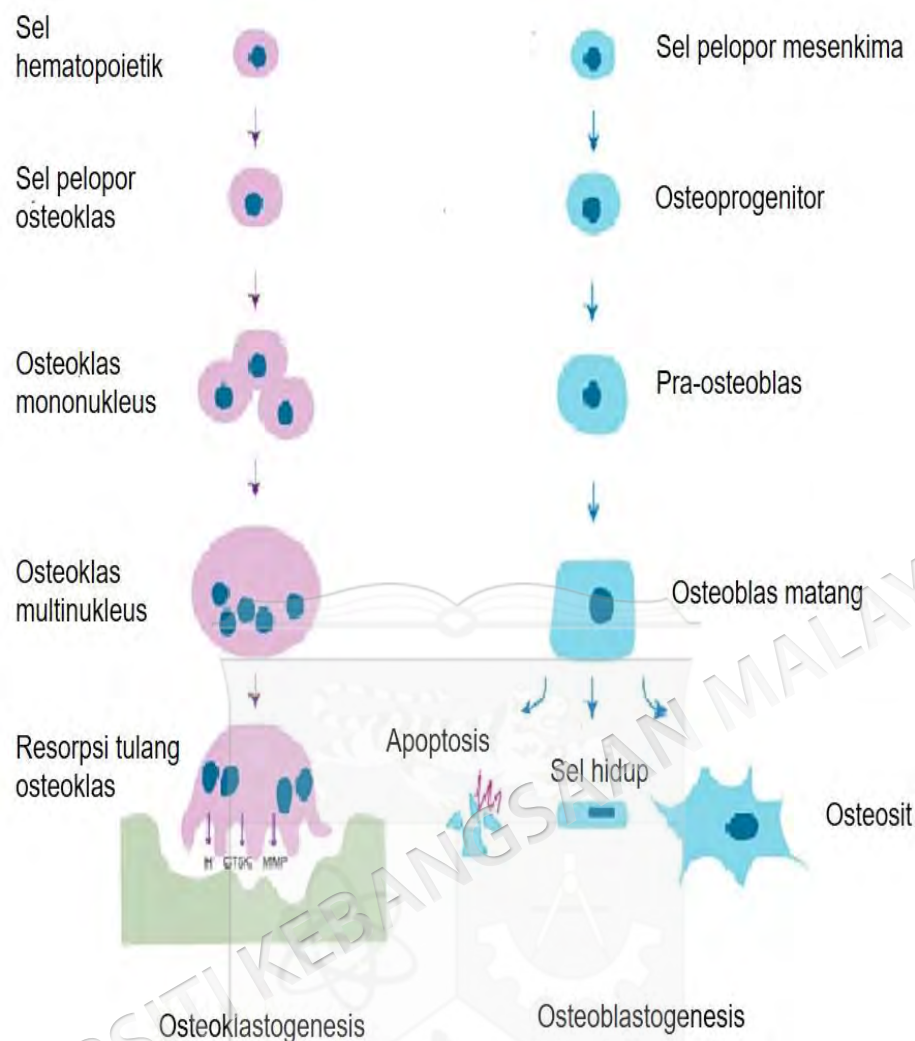
Bentuk sel osteosit seakan bintang dengan saiz yang lebih kecil berbanding sel osteoblas. Sel osteosit merupakan sel yang paling banyak terdapat di dalam tisu tulang di mana merangkumi 95% populasi sel dan bergantung kepada usia serta saiz tulang (Niedźwiedzki & Filipowska 2015). Sel osteosit yang matang berada di dalam jaringan lakuna-kanalikuli tulang. Sel osteosit merupakan perantara yang memudahkan

pengangkutan nutrien, oksigen serta molekul pengisyarat yang lain seperti prostaglandin dan nitrik oksida. Apabila sel osteosit terperangkap di dalam matriks tulang, ekspresi penanda biokimia osteoblas seperti osteokalsin, kolagen jenis 1 dan alkaline fosfatase akan menurun. Apabila sel osteosit mengalami apoptosis, ini menunjukkan pengisyaratan untuk sel osteoklas memulakan proses resorpsi (Rutkovskiy et al. 2016).

c. Sel Osteoklas

Sel osteoklas berasal daripada sel hematopoietik dan berfungsi untuk penyerapan semula (resorpsi) tulang. Sel osteoklas adalah sel multinukleus dan merupakan prekursor kepada makrofaj. Sewaktu proses resorpsi tulang, sel osteoklas akan melekat dan terikat dengan kuat pada matriks di permukaan tulang dengan menggunakan podosom-aktin. Pada zon tersebut, sel osteoklas akan membentuk membran ropol untuk meningkatkan luas permukaan membran sel untuk merembeskan asid hialuronik dan enzim proteolitik katepsin K ke permukaan tulang (Kim et al. 2020).

Setelah itu, kedua-dua rembesan ini akan melarutkan mineral dan mendegradasikan tulang matriks bagi menghasilkan pembentukan pit. Setelah itu, sel osteoklas akan menghasilkan asid fosfatase rintang tartrat (TRAP). TRAP merupakan penanda biokimia bagi sel osteoklas yang matang. Kadar pembentukan tulang adalah berhubung rapat dengan kadar resorpsi tulang. Hal ini kerana kerana sel osteoklas berperanan dalam mengatur jisim tulang (Martim & Sims 2005). Strategi aturan sel osteoblas dan sel osteoklas diringkaskan seperti gambar rajah 2.4.



Rajah 2.4

Strategi aturan sel osteoblas dan sel osteoklas

Sumber: Ubahsuai daripada Kim et al. 2020

2.1.4 Pemodelan Tulang

Pemodelan tulang didefinisikan sebagai proses pembentukan tulang oleh sel osteoblas atau resorpsi tulang oleh sel osteoklas pada permukaan tertentu (Allen & Burr 2014). Fungsi utama pemodelan tulang adalah meningkatkan jisim tulang dan mengekalkan atau mengubah bentuk tulang. Pemodelan tulang berlaku sewaktu kelahiran sehinggalah meningkat dewasa. Kadar pembentukan tulang atau kadar resorpsi tidak semestinya berkadaran tetapi dikoordinasi untuk memelihara keutuhan tulang (Pepa et al. 2016).

Aktiviti pemodelan tulang berlaku pada periosteum, endokortikol dan permukaan trabekular tulang. Pada peringkat pembentukan tulang, sel osteoblas secara aktifnya akan menghasilkan matriks tulang. Proses pembentukan tulang serta resorpsi tulang akan berulang sehinggalah jisim tulang ditambah atau disingkirkan mengikut adaptasi ruangan tulang tersebut. Pembentukan tulang bermula dari awal kelahiran sehinggalah meningkat dewasa, dan akan bergerak perlahan setelah dewasa (Allen & Burr 2014).

2.1.5 Pemodelan Semula Tulang

Proses pembentukan semula biasanya berlaku untuk membaiki kepatahan mikro pada tulang bagi memastikan pemulihan tulang yang optimum. Pemodelan semula tulang biasanya berlaku pada peringkat dewasa bagi mengekalkan jisim tulang. Pemodelan semula tulang penting bagi mengekalkan kekuatan dan memelihara homeostasis mineral tulang (Pepa et al. 2016).

Pemodelan semula tulang melibatkan dua aktiviti, iaitu proses resorpsi tulang oleh sel osteoklas diikuti oleh aktiviti pembentukan tulang oleh sel osteoblas pada permukaan tulang yang sama. Proses pembentukan semula tulang berlaku pada permukaan tulang di kawasan periosteum, endokortikol, trabekular dan intrakortikol (Allen & Burr 2014). Namun begitu proses pemodelan semula meningkat terutamanya pada golongan wanita perimenopaus dan permulaan menopaus. Proses pemodelan semula tulang melibatkan empat fasa (Rajah 2.5) iaitu fasa pengaktifan, resorpsi, pembalikan serta pembentukan tulang (Borciani et al. 2020)



Rajah 2.5

Proses pemodelan semula tulang

Sumber: Ubahsuai daripada Borciani et al. 2020

a. Fasa Pengaktifan

Tahap pertama pembentukan tulang melibatkan pengesanan isyarat pengaktifan pembentukan tulang. Pengaktifan adalah proses berterusan yang berlaku di kawasan tulang di mana isyarat ini terhasil akibat daripada regangan mekanikal pada tulang yang mengakibatkan kerosakan struktur atau kesan tindak balas hormon seperti estrogen dan PTH ke atas sel-sel tulang sebagai tindak balas kepada perubahan sistematik homeostasis (Delaisse 2014).

b. Fasa Resorpsi

Setelah sel-sel osteoblas matang hadir, sel lapisan tulang akan mendedahkan matriks mineral kepada sel osteoklas. Sel osteoklas secara aktifnya akan melarutkan mineral matriks dan osteoid matriks. Terdapat dua langkah yang terlibat; pertama pengasidan matrik tulang bagi melarutkan komponen bukan organik dan pembebasan enzim lisosom seperti Katepsin K dan MMP9. Kedua-dua enzim ini bertugas untuk degradasi komponen organik tulang (Nadia 2008). Setelah fasa resorpsi tamat, sel osteoklas mengalami

apoptosis dan tiada penyerapan berlebihan akan berlaku. Tempoh masa proses resorpsi berlangsung selama 2-4 minggu (Kenkre1 & Bassett 2018).

c. Fasa Pembalikan

Pada fasa pembalikan, resorpsi tulang beralih kepada proses pembentukan tulang. Apabila proses resorpsi dan osteoklas selesai menyerap semula tulang, serpihan kolagen yang tersisa di permukaan mesti dikeluarkan. Sekiranya serpihan ini tidak dikeluarkan maka pembentukan tulang baru oleh osteoblas tidak akan berterusan (Delaisse 2014).

d. Fasa Pembentukan Tulang

Setelah fasa resorpsi selesai, sel osteoklas yang ditanggalkan daripada permukaan tulang seterusnya digantikan dengan sel pra-osteoblas bagi memulakan proses pembentukan tulang. Sel pra-osteoblas akan mengekspresikan protein morfogenetik tulang (BMP) yang bertanggungjawab secara aktif dalam pembezaan tulang. Sel osteoblas yang telah matang akan mensintesis osteoid dan memenuhi ruang kaviti resorpsi. Proses mineralisasi osteoid akan berlaku dalam dua fasa. Pada fasa pertama iaitu fasa primer ion kalsium akan bergabung dengan ion fosfat dan mineral hidroksiapatit. Fasa ini akan berpanjangan dalam tempoh 2-3 minggu (Delaisse 2014).

Sebahagian besar sel osteoblas (90%) yang telah matang akan mengalami apoptosis dan akan digantikan dengan penghasilan sel osteoblas yang baru. Sebahagian kecil osteoblas yang lain akan berada di matrik osteoid dan akhirnya menjadi osteosit. (Allen & Burr 2014). Osteosit memainkan peranan penting dalam memberi isyarat bagi berakhirnya proses pembentukan semula. Sel-sel osteosit akan terus berhubung dalam matrik tulang bagi mengekalkan keupayaan dalam menghasilkan matrik tulang. Setelah kitaran ini selesai, jumlah tulang yang terhasil adalah sama dengan kadar tulang mengalami resorpsi. Pada waktu tertentu, sebahagian besar permukaan tulang akan dilitupi dengan sel lapisan tulang (*bone lining cells*) dan akan berada dalam keadaan fasa rehat (Kenkre1 & Bassett 2018).

2.1.6 Tempoh Kitaran Pembentukan Semula Tulang

Dalam kitaran normal, proses pembentukan semula tulang yang lengkap memerlukan masa sekitar 4-6 bulan daripada tempoh masa pengaktifan sehinggalah sel osteoblas selesai menghasilkan matriks. Mineralisasi matriks akan berterusan selama berbulan-bulan. Tempoh kitaran pembentukan semula tidak terbahagi secara sekata bagi peringkat resorpsi dan pembentukan. Pada kebiasaannya osteoklas akan menyerap tulang sekitarnya dalam tempoh tiga hingga enam minggu. Peringkat pembentukan tulang berlangsung dalam tempoh empat bulan sehingga setahun (Kenkre1 & Bassett 2018).

2.2 OSTEOPOROSIS

2.2.1 Osteoporosis dan Prevalens

Osteoporosis ditakrifkan sebagai penyakit sistemik skeletal dengan ciri jisim tulang yang rendah, kerosakan pada mikrostruktur tisu tulang dan diikuti dengan peningkatan kerapuhan tulang dan seterusnya meningkatkan risiko kepatahan (Qaseem et al. 2017). Osteoporosis tidak bergejala dan sering tidak didiagnos sehinggalah pesakit datang ke hospital dengan kepatahan pada bahagian pinggul, pelvis atau pergelangan tangan. Komplikasi klinikal yang paling teruk daripada osteoporosis adalah kepatahan tulang. Insidens osteoporosis meningkat seiring dengan meningkatnya populasi berusia lanjut (Kuo & Chen 2017). Diagnosa osteoporosis dibuat berdasarkan nilai skor T yang dikira melalui penilaian ketumpatan tulang (BMD) dengan mengguna mesin 'Dual *energy X-ray absorptiometry*' (DXA). Berdasarkan kriteria yang dibuat oleh Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO), osteoporosis ditakrifkan sebagai penanda skor T kurang daripada -2.5.

Kepatahan tulang yang disebabkan oleh osteoporosis boleh menyebabkan rasa sakit yang berlarutan, kecacatan serta gejala psikologi seperti kemurungan. Kekerapan osteoporosis dipengaruhi oleh faktor bangsa dan etnik. Orang Kaukasia dan Asia lebih cenderung menghadapi osteoporosis berbanding orang berkulit hitam (Wright et al. 2012). Data perbandingan etnik di Malaysia menunjukkan 67% pesakit yang mengalami kepatahan tulang pinggul adalah etnik Cina diikuti, Melayu dan India (Damodran et al. 2000). Osteoporosis dihadapi empat kali lebih biasa pada golongan wanita berbanding

lelaki namun beberapa kajian menunjukkan lelaki cenderung untuk mendapat lebih banyak komplikasi berkaitan osteoporosis (Feidstein et al. 2003) disebabkan kecederaan ketika menjalankan aktiviti fizikal (Kiebzak et al. 2002).

Ketumpatan tulang meningkat bermula sejak lahir dan mencapai puncak pada kedua-dua jantina pada pertengahan dua puluhan sehingga awal tiga puluhan. Dari usia 50 tahun, kepadatan tulang lelaki menurun sekitar 0.2% sehingga 0.5% per tahun. Kehilangan ketumpatan tulang lelaki bermula secara progresif dan ketara daripada usia 30 dan berterusan sepanjang hayat. Kenyataan ini disokong lagi melalui hasil kajian Chin et al., pada tahun 2013 yang menunjukkan kesihatan tulang lelaki mula menurun sejak usia 30 an.

Laporan pada 2010, menyatakan bahawa di Eropah serta Amerika Syarikat, hampir 30% wanita menghidap osteoporosis dan dianggarkan 40% wanita pasca menapaus dan 30% lelaki akan mengalami kepatahan tulang sepanjang hayat (Watts et al. 2010). Manakala kajian yang dibuat oleh Yayasan Osteoporosis Antarabangsa di Eropah menganggarkan hampir 200 juta menderita osteoporosis dengan kira-kira 8.9 juta mengalami kepatahan tulang disebabkan oleh osteoporosis (Hernlund et al. 2013). Kepatahan yang paling kerap berlaku disebabkan osteoporosis adalah tulang belakang, tulang pinggul dan pergelangan tangan (Cosman et al. 2014). Kajian yang dibuat oleh Lee dan Khir pada tahun 2007, menunjukkan 1.6 juta daripada 30 juta populasi penduduk yang berumur 65 tahun mengalami osteoporosis (Lee & Khir 2007). Kajian oleh pasukan Cheung menjangkakan kepatahan tulang pinggul rakyat Malaysia akan mengalami peningkatan insiden kepatahan sebanyak 3.55 kali lebih tinggi pada tahun 2050 berbanding data pada tahun 2018 (Cheung et al. 2018).

Kualiti tulang ditakrifkan dengan sifat tulang yang menyumbang kepada kekuatan tulang (Bouxsein 2003). Kekuatan keseluruhan tulang bergantung kepada kepadatan tulang dan kualiti tulang. Keupayaan tulang untuk menahan kepatahan bergantung kepada beberapa faktor seperti jisim tulang, struktur tulang dan pembentukan semula (Jadual 2.1). Jisim tulang puncak dicapai pada usia 18 - 25 tahun dengan sebahagian besarnya dipengaruhi oleh faktor genetik. Penentuan jisim puncak juga dipengaruhi dengan pemakanan, status endokrin, aktiviti fizikal serta tumbesaran seseorang. Kualiti

tulang melibatkan ketahanan tulang daripada kepatahan dimana melibatkan struktur mikro tulang, kerosakan mikroskopik yang terkumpul, kualiti kolagen dan tahap mineralisasi. Pembentukan semula tulang tidak akan mengubah bentuk tulang, tetapi pembentukan tulang adalah bagi menjamin keseimbangan antara pembentukan tulang baru dan resorpsi tulang. Pembentukan tulang berfungsi dalam memperbaharui sel tulang khususnya sel osteosit (G. Borciani et al. 2020).

Jadual 2.1 Faktor Kekuatan Tulang

Jisim Tulang
Kualiti Tulang
• Struktur tulang • Kerosakan mikro • Mineralisas • Ciri kolagen
Pembentukan semula Tulang

Sumber: Ubahsuai daripada Pouresmaeili et al. 2018

2.2.2 Faktor risiko Osteoporosis

Terdapat beberapa faktor risiko yang menyebabkan osteoporosis. Faktor tersebut disenaraikan seperti dalam Jadual 2.2. dan Jadual 2.3.

Jadual 2.2 Faktor Risiko Utama Osteoporosis

FAKTOR RISIKO UTAMA	
Faktor Risiko Utama Boleh Ubah	Kekurangan penyerapan nutrisi Kekurangan aktiviti fizikal Kehilangan berat badan Merokok Pengambilan alkohol
Faktor Risiko Utama Tidak Boleh Ubah	Sejarah kepatahan tulang Pertambahan usia Kekurangan hormone seks

Sumber: Ubahsuai daripada Pouresmaeili et al. 2018

Jadual 2.3

Faktor Risiko Sekunder Osteoporosis

FAKTOR RISIKO SEKUNDER

Faktor Risiko Sekunder	Pengambilan ubatan dalam tempoh yang panjang (contoh, ubat kortikosteroid) Hipogonadisme Hipertiroidisme Penyakit Hati Kronik Inflamasi (Rheumoid Arthritis) Kekurangan Vitamin D Penyakit Kardiovaskular Masalah Ginjal (Sejarah Batu Pada Ginjal) Diabetes Mellitus Dementia
-------------------------------	---

Sumber: Ubahsuai daripada Pouresmaeili et al. 2018

2.2.3 Rawatan Osteoporosis: Terapi Bukan Farmakologi

Terapi bukan farmakologi melibatkan suplementasi kalsium dan vitamin D serta senaman.

a. Suplementasi Kalsium serta Vitamin D

Vitamin D merupakan komponen penting dalam membantu penyerapan kalsium dan kesihatan tulang. Sehubungan itu, suplementasi vitamin D serta kalsium di dalam diet harian membantu mencegah osteoporosis. Pengambilan vitamin D boleh diperolehi daripada sumber makanan seperti daging, minyak ikan serta tuna. Pakar daripada Institut Perubatan Amerika Syarikat mencadangkan pengambilan vitamin D sebanyak 600 IU sehari untuk warga emas berusia 51 -70 tahun dan 800 IU sehari untuk warga tua berusia melebihi 70 tahun (Taylor et al. 2011). Cadangan yang sama juga dibuat bagi pengambilan diet mengandungi kalsium. Pihak Institut Perubatan Amerika Syarikat mencadangkan pengambilan kalsium adalah sebanyak 100 mg bagi lelaki berusia 50-70 tahun dan 1200 mg bagi wanita berusia 51 tahun ke atas (Taylor et al. 2011).

b. Senaman

Beberapa kajian lepas secara konsistennya melaporkan bahawa kesan senaman membantu memelihara jisim mineral pada tulang belakang dan tulang paha warga tua (Guadalupe et al. 2009; Morseth et al. 2011; Langsetmo et al. 2012). Senaman dan latihan aerobik dengan menggunakan platform bergetar dapat memberi kesan dalam meningkatkan kepadatan mineral tulang. Bukti ini di anggap relevan bukan sahaja bagi meningkatkan kepadatan tulang kepada wanita pascamenopausal tetapi bagi mengatasi risiko kepatahan tulang (Benedetti et al. 2018).

2.2.4 Rawatan Osteoporosis: Terapi Farmakologi

Terapi farmakologi terdiri daripada terapi penggantian estrogen, modulator reseptor estrogen selektif (SERM) dan agen anabolik. Kebanyakan rawatan osteoporosis memberi fokus dalam menghalang penyerapan semula tulang atau merangsang pembentukan tulang (Augustine et al. 2013; Reginster et al. 2013).

a. Terapi Penggantian Estrogen (ERT)

Rawatan terapi penggantian estrogen (ERT) kepada wanita pascamenopaus menunjukkan rawatan ini telah memberi kesan anti resorpsi di mana mencegah kelesapan tulang dan juga memberi kesan anabolik dengan meningkatkan pembentukan tulang. Kajian yang dibuat oleh Manson et al. pada tahun 2013 menunjukkan dos sebanyak 0.625 mg/hari estrogen konjugat atau 5 mg/hari kombinasi estrogen dan progesteron telah menurunkan risiko kepatahan tulang. Bagi tempoh jangka panjang penggunaan rawatan ini mendatangkan kesan sampingan seperti kanser payudara, kanser endometrium dan penyakit kardiovaskular yang lain seperti serangan strok serta thromboembolisme (Lobo 2017).

b. Modulator Reseptor Estrogen Selektif (SERM)

Modulator Reseptor Estrogen Selektif (SERM) merupakan sebatian spesifik yang berupaya mengikat dengan afiniti tinggi sama ada pada estrogen alfa ($ER\alpha$) atau pun estrogen beta ($ER\beta$). SERM bertindak secara agonis atau antagonis estrogen pada tisu-tisu. Pada peringkat awal rawatan SERM seperti tamoxifen dan raloxifen digunakan untuk pencegahan dan rawatan kanser payudara namun begitu rawatan tersebut didapati mampu memelihara jisim tulang. Tamoxifen telah diguna lebih 30 tahun untuk rawatan tambahan bagi mencegah kanser payudara pada wanita yang berisiko dan memelihara jisim tulang. Namun begitu penggunaan tamoxifen dikaitkan dengan peningkatan risiko kanser payudara invasif, tromboembolisme dan katarak (Nazarali & Narod 2014).

Raloxifene adalah SERM pertama yang telah diluluskan untuk rawatan dan pencegahan osteoporosis pada wanita pascamenopaus di Eropah dan kemudian diamalkan di beberapa negara lain. Raloxifene digunakan untuk pencegahan osteoporosis pascamenopaus kerana terbukti berjaya mengurangkan pelepasan tulang, dan meningkatkan jisim mineral (Grady D et al. 2004). Raloxifene mempunyai kesan merendahkan risiko hiperplasia endometriosis, katarak dan thromboembolisme (Vogel et al. 2006).

SERM generasi ketiga iaitu bazedoxifen telah dinilai secara meluas di dalam kajian pra-klinikal bagi menyokong penggunaannya sebagai rawatan pencegahan dan rawatan osteoporosis pascamenopaus. Hasil kajian klinikal dibuat mendapati rawatan Bazedoxifene mengurangkan penggantian tulang, mengekalkan atau meningkatkan jisim mineral tulang vertebra berbanding rawatan placebo (Miller et al. 2008). Bazedoxifene didapati lebih selamat dan diterima dengan baik tanpa menimbulkan rangsangan kejadian endometrium atau kanser payudara. Data kajian tersebut memberi manfaat klinikal yang signifikan kepada wanita pascamenopaus atau berisiko mengalami osteoporosis (Miller et al. 2008).

c. Agen Anabolik

Agen anabolik mempengaruhi proses yang berkaitan dengan pembentukan tulang. Agen anabolik berpotensi memberi kesan positif kepada jisim mineral tulang, saiz tulang serta mikrostruktur tulang (Meunier et al. 2004). Perkara ini bagi merangsang proses pembentukan tulang yang lebih tinggi berbanding proses resorpsi tulang. Contoh agen anabolik adalah hormon paratiroid (PTH) atau teriparatide.

PTH akan merencatkan apoptosis sel osteoblas pada tulang trabekular dan bahagian periosteum tulang. PTH juga akan meningkatkan proliferasi praosteoblas. Pada masa sama PTH akan menurunkan penghasilan sklerostin oleh sel osteosit untuk membenarkan pembezaan sel osteoblas dan memanjangkan jangka hayat osteoblas sebelum mengalami apoptosis (Jilka et al. 2009). Namun begitu pengambilan hormon PTH dalam dos yang tinggi mengakibatkan peningkatan proses resorpsi tulang di mana reseptor PTH akan mengikat pada sel osteoblas dan meningkatkan penghasilan RANKL untuk mengaktifkan proses resorpsi tulang (Gallagher & Sai 2010).

d. Agen Anti –Resorpsi Tulang

Bisfosfonat adalah pilihan utama bagi merawat dan mencegah osteoporosis dalam kalangan wanita pascamenapaus atau pun pada pesakit osteoporosis akibat glukokortikoid (Das & Crockett 2013). Bisfosfonat boleh didapati dalam pebagai formulasi seperti alendronate, ibandronate dan risedronate. Bisfosfonat akan diekspresi keluar oleh ginjal. Oleh itu, pengambilan bisfosfonat tidak sesuai untuk pesakit yang mempunyai masalah ginjal atau pengeluaran kreatinin yang terlampau tinggi (Binosto 2015).

Bifosfonat mampu menurunkan aktiviti resorpsi tulang dengan meningkatkan kadar apoptosis sel osteoklas. Bifosfonat mempunyai afiniti yang tinggi terhadap hidroksiapatit dan seterusnya akan mengaruh keadaan apoptosis sel osteoklas. Bisfosfonat akan mengikat kuat pada tisu di kawasan aktif pemodelan tulang. Kemudian ia boleh mengikat semula pada tisu mineral dan akan kekal di dalam tulang untuk tempoh masa 10 tahun (Russell et al. 2008). Selain itu, bisfosfonat juga merencat aktiviti farnesil pirofosfat (FFP) pada tapak jalan mevalonat yang mana boleh merencat pembentukan

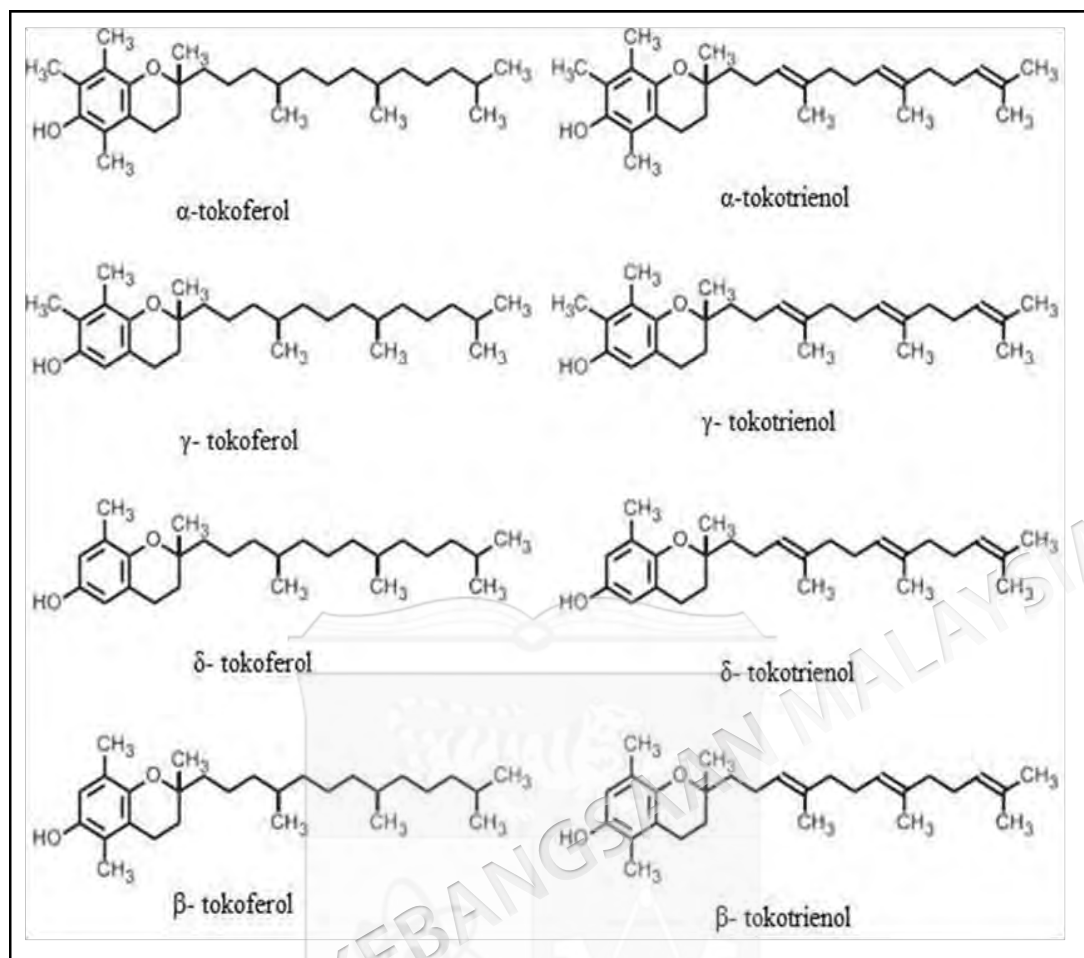
tulang (Caraglia et al. 2006; Maeda & Castro 2014). Kajian yang dibuat pada tahun 2010 mendapati pengambilan bisfosfonat memberi kesan samping seperti osteonekrosis pada bahagian rahang (Filleul et al. 2010).

2.3 VITAMIN E

2.3.1 Vitamin E

Vitamin E adalah vitamin larut lemak yang banyak didapati daripada sumber semulajadi. Vitamin E boleh didapati daripada kelapa sawit, barli, oat dan dedak padi. (Aggarwal et al. 2010). Vitamin E terdiri daripada dua keluarga sebatian iaitu tokotrienol serta tokoferol (Rajah 2.6). Sebatian ini dicirikan dengan cincin 6-kromanol dan rantai sisi isoprenoid 15 karbon. Kedua-dua keluarga ini mempunyai empat isomer yang telah ditetapkan iaitu alfa (α), beta (β), gama (γ) serta delta (δ) di mana mengikut lokasi kumpulan metil yang melekat pada cincin kromanol. Ikatan ganda dua pada rantai karbon tokotrienol membezakannya dengan tokoferol (Singh & Hauer-Jensen 2016).

Isomer-isomer pada vitamin E dibezakan berdasarkan lokasi kumpulan metil pada cincin kromanol iaitu i) α -tokotrienol adalah 5, 7, 8-trimetil, ii) β -tokotrienol adalah 5,8-dimetil, iii) γ -tokotrienol adalah 7,8, -dimetil dan iv) δ -tokotrienol adalah monometil (rajah 2.6). Kajian membuktikan bahawa vitamin E mempunyai kesan antioksidan yang tinggi dan merupakan antioksidan yang larut lipid pada manusia (Nesaretnam et al. 1995). Hal ini disebabkan oleh kehadiran kumpulan fenolik dalam cincin kromanol yang meneutralkan radikal bebas dengan menukarnya menjadi produk yang lebih stabil (Baj et al. 2019).



Rajah 2.6

Struktur isomer-isomer tokoferol dan tokotrienol

Sumber: Ubahsuai daripada Singh & Hauer-Jensen 2016

2.3.2 Tokotrienol dan Tokoferol

Minyak kelapa sawit mengandungi kandungan tokotrienol yang tinggi (Atia & Abdullah 2013; Sen et al. 2010). Vitamin E yang terdapat dalam minyak kelapa sawit terdiri daripada 70% tokotrienol serta 30% tokoferol (Sen et al. 2010). Kebanyakan ujian klinikal menggunakan tokoferol (Sen et al. 2007). Walau bagaimanapun, kajian juga membuktikan bahawa tokotrienol mempunyai kesan yang lebih baik berbanding tokoferol. Perkara ini terbukti apabila kajian *in vitro* menunjukkan tokotrienol berpotensi sebagai antioksidan, anti radang, anti barah, anti penuaan, anti trombotik dan anti-angiogenik yang lebih baik berbanding tokoferol (Miyazawa et al., 2008; Wu et al., 2009; Aggarwal et al., 2010).

Tokotrienol juga dilaporkan lebih berkesan dalam pencegahan perkembangan penyakit berbanding tokoferol (Inokuchi et al. 2003; Mizushina et al 2006; Qureshi et al 1991). Kajian potensi tokotrienol terhadap kesihatan boleh dilihat melalui pelbagai kajian haiwan. Sebagai contoh, kajian sebelum ini membuktikan tokotrienol lebih berkesan daripada tokoferol dalam peroksidasi lipid serta oksidasi protein pada mitokondria otak tikus serta mikrosom hepar (Budin et al. 2009). Satu kajian terbaru juga dilakukan ke atas tikus menunjukkan pengambilan tokotrienol dapat melindungi hepar daripada kerosakan oksidatif subkronik fenitrothion (Jayusman et al. 2017). Hasil kajian haiwan yang lain juga menunjukkan suplementasi tokotrienol bagi jangka masa panjang secara ketara meningkatkan aktiviti enzim antioksidan pada otot rangka dan jantung pada model tikus berusia (Karim et al. 2015). Kajian Wong et al (2020) menunjukkan rawatan tokotrienol mengurangkan TLR2, MyD88, NF- κ B fosforilasi dan peningkatan tahap IL-10 (sitokin anti-radang) di hepar tikus yang diberi diet tinggi karbohidrat dan tinggi lemak (Wong et al. 2020).

2.3.3 Peranan Tokotrienol Dalam Pembentukan Tulang

Minyak sawit memiliki kandungan tokotrienol yang tertinggi berbanding minyak bran beras. Tokotrienol berpotensi sebagai agen antioksidan dan antikeradangan dalam membantu memelihara kesihatan tulang. Peningkatan tekanan oksidatif serta keradangan menyebabkan ketidakseimbangan pembentukan semula tulang yang seterusnya boleh mengakibatkan berlakunya masalah osteoporosis. Tokotrienol menunjukkan aktiviti antioksidan yang lebih baik berbanding tokoferol kerana keseragaman peredaran di dalam membran sel serta keberkesanan yang lebih tinggi dalam kitaran semula radikal serta interaksi dengan radikal lipid (Serbinova et al. 1991).

Kajian haiwan yang dibuat oleh Muhammad dan rakannya pada 2012 menunjukkan bahawa rawatan tokotrienol sebanyak 60 mg/kg terhadap tikus betina menurunkan permukaan sel osteoklas. Kajian yang dibuat oleh Chin serta Ima-Nirwana pada tahun 2014 menunjukkan tokotrienol dapat meningkatkan ekspresi gen yang berkaitan pembentukan tulang dan aktiviti osteoblas seperti ALP, β -Katenin, kolagen jenis 1 alfa serta osteopontin (Chin & Ima-Nirwana 2014). Kajian dilanjutkan lagi dan hasil kajian menunjukkan suplementasi tokotrienol meningkatkan bilangan sel osteoblas,

permukaan osteoid, isipadu osteoid serta mengurangkan permukaan yang terhakis serta bilangan sel osteoklas kepada tikus jantan (Chin et al. 2014).

Supplementasi tokotrienol daripada kelapa sawit dan annatto memberikan kesan anabolik positif kepada struktur tulang seperti peningkatan isipadu tulang, bilangan trabekular serta penurunan pemisahan trabekular pada tikus osteoporosis kekurangan testosterone (Chin & Ima-Nirwana 2014) serta pada model tikus sindrom metabolik (Wong et al. 2018). Kajian yang dibuat oleh Wong bersama rakan-rakan menunjukkan suplementasi tokotrienol berjaya memperbaiki mikrostruktur tulang trabekular dan meningkatkan kekuatan tulang melalui kesan anti keradangan (Wong et al. 2018).

Hasil kajian secara *in vitro* mendapati tokotrienol membantu merencat pembentukan sel osteoklas (Ha et al. 2011) membantu ekspresi gen bagi pembentukan tulang (Ahn et al. 2011) serta membantu perkembangan sel osteoblas yang diaruh dengan tekanan oksidatif (Nizar et al. 2011). Kajian terdahulu yang dibuat oleh Brooks pada 2011 menunjukkan γ -tokotrienol mampu mengurangkan pembentukan TRAP dan aktiviti penyerapan semula. Penggunaan kepekatan γ -tokotrienol yang lebih tinggi memberikan perencatan yang lebih besar terhadap pembentukan dan aktiviti sel osteoklas (Brooks et al. 2011). Penemuan Xu dan rakan-rakan juga menunjukkan γ -tokotrienol pada kepekatan rendah 4 $\mu\text{mol/L}$ telah menggalakkan proliferasi, pembezaan dan pemineralan sel pra-osteoblas iaitu sel selanjara MC3T3 –E1 (Xu et al. 2018). Apabila perbandingan dibuat, kajian mendapati α -, γ - dan δ - tokotrienol menunjukkan perencatan yang lebih besar pada pembentukan sel osteoklas (Brooks et al 2011).

2.4 PENGKULTURAN SEL TULANG SECARA *IN VITRO*

2.4.1 Pembentukan Semula Tulang Secara *in Vitro*

Seiringan dengan pengembangan kajian serta keinginan untuk mengurangkan penggunaan model haiwan osteoporosis, para penyelidik telah memberi tumpuan kepada pengembangan model secara *in vitro* menggunakan sel primer atau sel selanjara bagi memprolehi hasil kajian pra-klinikal yang lebih relevan. Model *in vitro* membolehkan

kajian dibuat menggunakan sel yang di ambil daripada manusia. Secara umumnya pemodelan tulang secara *in vitro* boleh dibuat melalui kaedah pengkulturan berikut:

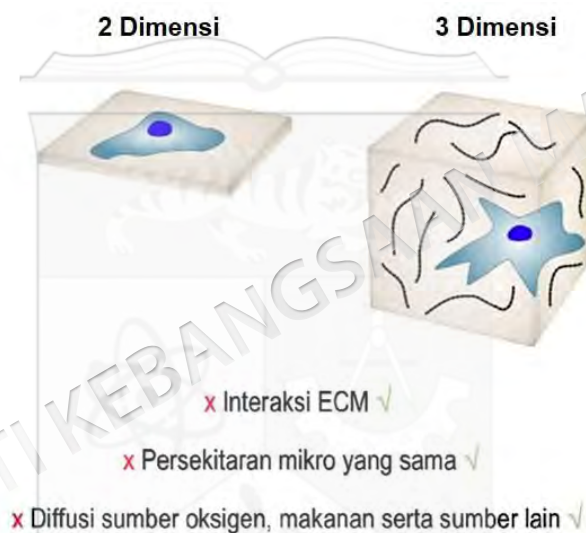
- i. Kultur tulang secara dua dimensi (2D)
Sel diekstraksi daripada tisu tulang dan dikulturkan secara mono lapisan dua dimensi pada piring kultur plastik yang rata (Cukierman et al. 2001).
- ii. Kultur tulang secara 3 Dimensi (3D)
Sel akan diektrak daripada tisu tulang dan dikultur ke dalam perancah atau matriks (Cukierman et al. 2001).

Kedua-dua kategori kultur ini digunakan dalam kajian pembentukan semula tulang. Model-model ini sama ada disediakan menggunakan satu jenis sel atau gabungan beberapa jenis sel yang berkaitan tulang (Edmondson et al. 2014).

Pengkulturan secara 2D membolehkan kawalan dibuat secara langsung dengan persekitaran kultur. Kajian lepas menunjukkan bahawa transduksi isyarat dan fungsi selular berbeza antara 2D dan 3D (Cukierman et al. 2001; Ishii et al. 2001). Kajian ini selari dengan kajian yang dibuat oleh Elsdale dan Bard di mana berlaku perubahan morfologi sel fibroblas yang dikultur pada piring petri 2 D berbanding pengkulturan secara 3D. Pengkulturan secara 2D tidak mampu meniru keadaan mikro sekitaran tulang (Edmondson et al. 2014). Oleh itu, terdapat jurang saintifik yang menyebabkan pengkulturan 3D mempunyai kesesuaian yang lebih baik dalam menghasilkan semula mikro persekitaran secara *in vitro*. Melalui pengkulturan secara 3D, keadaan persekitaran kultur boleh dibangunkan semula dengan persekitaran mikro yang hampir sama dengan keadaan sebenar sel.

Pengkulturan secara 3D dapat menyediakan ruang serta kawalan dari segi mempertahankan morfologi dan fenotip yang tepat, serta melaksanakan fungsi fisiologinya. Kelemahan pengkulturan 2D adalah sel mono lapisan mendapat akses yang terhad bagi mendapatkan medium seperti oksigen, nutrien, metabolit serta molekul isyarat (Pampaloni et al. 2007). Pengkulturan secara 2D tidak mewujudkan interaksi persekitaran sel dan ekstrasel. Interaksi ini penting dalam membantu pembezaan sel,

ekspresi gen dan protein serta tindak balas terhadap rangsangan. Pengkulturan secara 3D boleh memberikan hasil interaksi sel-sel dan persekitaran dengan menerima rangsangan luar dan persekitaran setempat seperti yang berlaku secara *in vivo*. Rajah 2.7 menunjukkan ilustrasi kelebihan pengkulturan secara 3 dimensi. Selain tu, secara tidak langsung pengkulturan secara 3D dapat mengurangkan penggunaan model haiwan sebagai kajian penyelidikan. Penggunaan haiwan dalam kajian tidak dapat mewakili fisiologi dan anatomi manusia yang tepat. Ia tidak mampu memberikan terjemahan yang sebenar bagi ujian di peringkat pra-klinikal dan klinikal (Benam et al. 2015; McGonigle & Ruggeri 2013).



Rajah 2.7

Kelebihan pengkulturan secara 3 dimensi berbanding 2 dimensi

Sumber: Ubahsuai daripada G. Borciani et al. 2020

2.4.2 Penggunaan Tulang Perancah Sebagai Model Osteoporosis

Perancah adalah matriks sementara untuk pertumbuhan tulang dan menyediakan persekitaran dan seni bina khusus untuk pembangunan tisu. Tulang perancah bertindak sebagai templat bagi meniru fungsi matriks ekstraselular tulang. Tujuan penggunaan perancah adalah untuk menyediakan persekitaran 3D untuk perkembangan sel tulang (Benam et al. 2015). Bagi mencapai matlamat ini, perancah harus menunjukkan beberapa sifat yang membantu untuk pertumbuhan dan pengembangan sel tulang. Komposisi kimia serta permukaan perancah mempengaruhi aktiviti selular sel yang akan mempengaruhi percambahan dan pembezaan sel yang dikehendaki dan pelekatan sel ke

dalam perancah. Perancah yang ideal adalah perancah yang mampu untuk memperbaiki tisu dengan keperluan yang minimum, meningkatkan pertumbuhan sel dan membolehkan bahan buangan disingkir secara semulajadi semasa atau setelah proses penyembuhan (Roseti et al. 2017).

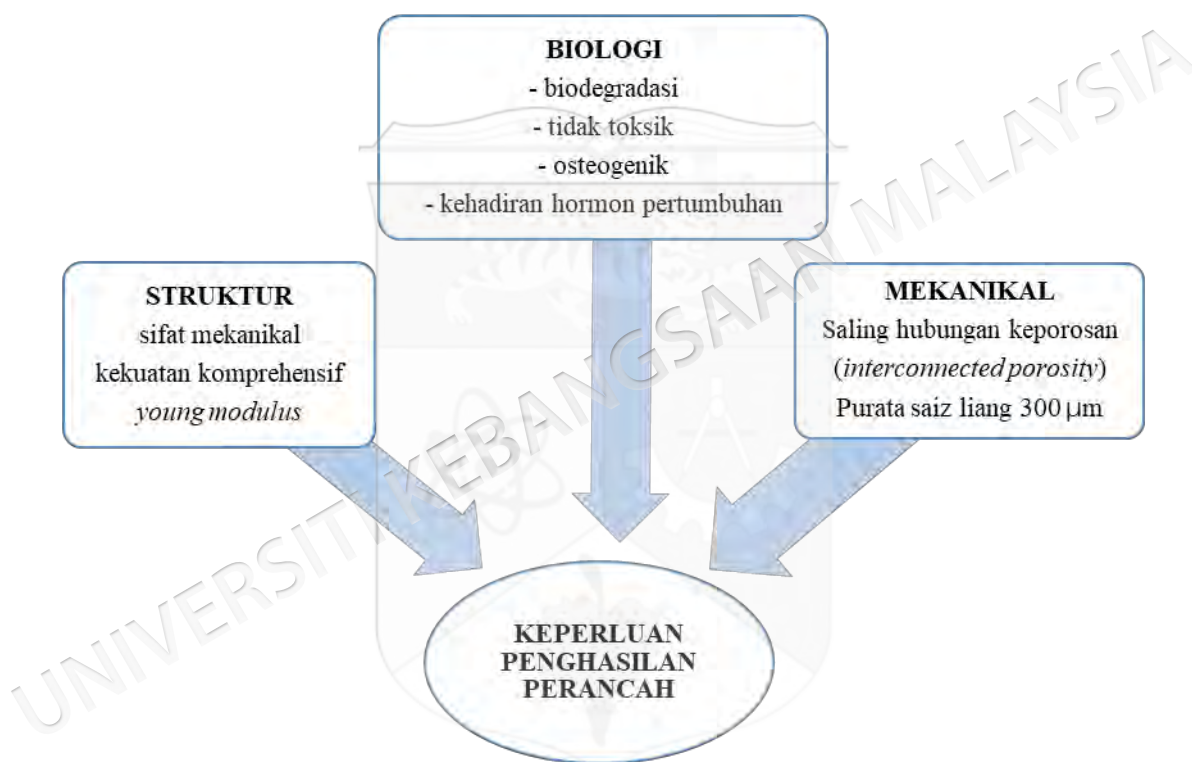
2.4.3 Keperluan Dalam Penghasilan Perancah

Untuk memenuhi keperluan perancah secara biologi beberapa faktor perlu diambil kira. Perancah yang dihasilkan mestilah bersesuaian, bersifat biodegradasi dan tidak toksik kepada sel (Roseti et al. 2017). Perancah yang terhasil akan menentukan anatomi tulang yang akan dihasilkan sewaktu proses penyembuhan tulang berlaku. Keupaayan perancah yang serasi akan menentukan kejayaan penghasilan perancah. Perancah yang terbaik merupakan perancah yang boleh mempromosi pembinaan sel yang baru melalui migrasi atau pembezaan sel, penyatuan antara sel dan perumah serta mengelakkan proses yang tidak diinginkan seperti pembentukan parut (Hoffman & Garcia 2011).

Penentu kejayaan penghasilan perancah perlulah memenuhi kriteria keperluan mekanikal. Penyediaan perancah perlulah disuai padankan dengan tisu perumah bagi mengurangkan risiko komplikasi seperti osteopenia setelah implantasi (Nyberg et al. 2016). Pada kebiasaannya perancah dibina untuk dipadankan dengan sifat mekanik tulang kanselus manusia yang mempunyai kekuatan mampatan antara 2 sehingga 12 MPa serta modulus elastik antara 0.1 sehingga 5 GPa (Nyberg et al. 2016).

Selain itu, bagi memastikan kejayaan dalam penghasilan perancah keperluan mekanikal juga perlu diambil kira. Keporosan perancah memainkan peranan dalam memastikan pertumbuhan dan penghijrahan sel serta aliran nutrien (Amini et al. 2012). Kajian lepas membuktikan bahawa perancah dengan saiz minimum 150 μm serta purata saiz 300 μm adalah optimum untuk pembentukan tisu tulang (Bose et al. 2013). Kajian juga menunjukkan purata saiz poros perancah melebihi 300 μm membantu angiogenesis dan seterusnya meningkatkan pembentukan semula tulang. Struktur perancah yang poros penting untuk saling hubungan antara perancah dengan tisu sekitarnya dan bagi memastikan kestabilan perancah setelah diimplan (Wu et al. 2014; Loh & Choong 2013). Selain itu, saling hubungan keporosan (*interconnected porosity*) ini penting bagi

memastikan pertumbuhan sel yang berterusan dan pembuangan keluar sisa buangan serta pengangkutan nutrien dapat diedarkan dengan baik ke ruangan dalam perancah (Liu et al. 2013). Saling hubungan keporosan ini juga penting bagi vaskularisasi tisu yang betul. Dengan itu cabaran utama dalam pembuatan perancah adalah menghasilkan perancah yang kuat dari segi mekanikal dengan keporosan yang mencukupi bagi mengekalkan vaskularisasi dan pengangkutan nutrient yang baik (De Witte et al. 2018). Rajah 2.8 merupakan ringkasan keperluan penghasilan perancah.



Rajah 2.8

Ringkasan keperluan perancah

Sumber: Ubahsuai daripada De Witte et al. 2018

2.5 Sel Osteoblas Dan Model Perancah Tulang

Dalam kajian ini, sel osteoblas fetus manusia, hFOB 1.19 merupakan sel osteoblas matang daripada fetus. Sel hFOB 1.19 merupakan model sel yang homogen di mana boleh berkembang dengan baik bagi kajian pembezaan sel, fisiologi serta pertumbuhan sel osteoblas normal. Aktiviti ALP mula menunjukkan peningkatan bermula dari hari ke

3 dan mula menurun setelah hari ke 14 pengeraman. Proses pemineralan matriks sel akan bermula pada hari ke 16 yang mana menjadi penanda kepada fasa akhir perkembangan sel osteoblas. Justeru itu, sel hFOB 1.19 menunjukkan ciri sel osteoblas dan berlaku pengeksperesan gen dan protein yang menyamai proses pembentukan tulang secara *in vitro* (Subramaniam et al.2002).

Dalam kajian ini juga, perancah tulang dihasilkan daripada tulang femur lembu. Bahagian tulang yang diambil adalah pada bahagian tulang kanselus. Tulang tersebut melalui proses mineralisasi dan disteril sebelum di jadikan perancah. Hasil perbandingan yang dibuat mendapati penggunaan tulang haiwan mamalia semulajadi menunjukkan kelebihan dari segi mengurangkan tindak balas imunogenik dan mengekalkan aktiviti biologi sel kerana strukturnya merupakan struktur tulang asli (Wang et al. 2010; Vavken et al. 2012).

Bahagian tulang yang dipilih adalah pada bahagian kanselus. Bahagian tulang kanselus dianggap sebagai model yang sesuai kerana mempunyai struktur sistem Haversian seperti pada tulang manusia. Tulang kanselus mempunyai aktiviti metabolik yang lebih tinggi daripada tulang kortikal dan mempunyai ciri osteokonduktif dan osteoinduktif yang tinggi (Velentin et al. 2008). Kajian yang dibuat oleh Shahabipour dan rakan-rakan pada 2013 membuktikan bahawa penggunaan tulang haiwan sebagai perancah berjaya melekatkan sel pada perancah dan berlaku pembentukan tisu yang baru. Hasil kajian tersebut membuktikan bahawa penggunaan tulang perancah berpotensi mewujudkan keadaan mikro sekitaran *in vitro* secara 3D (Shahabipour et al. 2013).

2.6 Penanda Biokimia Dalam Pemodelan Semula Tulang

Fosfatase alkali (ALP) merupakan enzim hidrolase yang berperanan menyingkirkan kumpulan fosfat daripada pelbagai jenis molekul. ALP merupakan glikoprotein yang terdapat pada permukaan sel osteoblas. Kehadiran ALP menandakan terdapat aktiviti biosintesis sel pembentukan tulang. Kajian oleh Setsu et al. menyatakan bahawa ALP merupakan penanda metabolisme tulang yang sensitif dan boleh dipercayai. Sewaktu proses penyembuhan atau pembentukan tulang, sel osteoblas secara aktif menghasilkan jaringan osteoid dan merembeskan sejumlah besar alkalin fosfatase. ALP mengaruh

peningkatan pemendapan kalsium dan fosfat di dalam tulang. Justeru itu ALP merupakan penanda awal dalam pembezaan sel osteoblas (Zhang et al. 2010).

Osteokalsin adalah salah satu protein bukan kolagen yg disintesis oleh sel osteoblas semasa pembentukan matriks tulang. Osteokalsin dikenali sebagai protein asid γ -karboksiglutamik yang dihasilkan oleh sel osteoblas. Osteokalsin terlibat dalam mineralisasi tulang di mana ia berfungsi sebagai penggalak kepada perlekatan ion kalsium untuk pembentukan hidroxyapatit (Willems et al. 2014). Jadi, osteokalsin penting dalam pemineralan osteoid dan memulakan proses pemineralan. Osteoklasin akan meningkat bersama-sama kolagen untuk membentuk protein matriks di dalam tulang. Pengukuran osteokalsin menjadi penanda biokimia bagi menilai kadar pembentukan tulang. Hal ini kerana pembentukan osteokalsin berkadaran dengan kepadatan mineral tulang (BMD) (Zoch et al. 2015).

2.7 Kajian Kesan Isomer Vitamin E Pada Tulang

Kajian bagi melihat kesan isomer vitamin E terhadap tulang telah dibuat dengan meluas di dalam kajian haiwan. Satu kajian yang dibuat oleh Ima-Nirwana et al. pada 2018 menunjukkan suplementasi campuran vitamin E daripada minyak sawit (22% α -tokoferol, 26.7% α -tokotrienol, 4% β -tokotrienol, 31.3% γ -tokotrienol dan 15.6% δ -tokotrienol) berjaya memelihara kesihatan tulang tikus jantan yang telah mengalami adrenalectomi. Kajian lain yang dibuat oleh Wong et al. (2018) melaporkan campuran tokotrienol daripada minyak sawit dan annatto tokotrienol meningkatkan mikrostruktur trabekular tulang tikus jantan yang diaruhkan dengan sindrom metabolik. Kajian Muhammad et al. (2012) mendedahkan bahawa kesan suplementasi campuran isomer vitamin E adalah setara dengan suplementasi kalsium dan terapi estrogen. Manakala Ahmad et al., 2005 melaporkan bahawa campuran isomer vitamin E berjaya meningkatkan permukaan osteoid, bilangan osteoblas dan jumlah bilangan osteoid pada tikus yang mengalami osteoporosis disebabkan feril nitrilotriacetate. Kajian yang dibuat oleh Deng et al. (2014) melaporkan keputusan tomografi berkomputer menunjukkan γ -tokotrienol meningkatkan mikrostruktur tulang. Kajian yang lain dibuat oleh Hermizi et al. (2009) melaporkan γ -tokotrienol lebih berkesan berbanding α -tokoferol dalam memelihara trabekular tulang pada tikus yang diberikan 7 mg/kg nikotin. Berdasarkan

senarai kajian *in vivo* yang disebutkan di atas, campuran tokotrienol banyak dibandingkan dengan tokoferol dengan kajian menunjukkan tokotrienol memberikan kesan perlindungan tulang yang lebih baik.

Selain itu, beberapa kajian secara *in vitro* dibuat untuk mengkaji potensi isomer vitamin E dalam membantu pembentukan tulang. Pembentukan tulang secara *in vitro* melibatkan pembezaan osteoblas dan pemineralan matrik ekstrasel. Kajian yang dijalankan oleh Mehranjani dan Azimi (2014) melaporkan bahawa rawatan vitamin E meningkatkan aktiviti ALP serta meningkatkan ekspresi gen osteopontin dan osteokalsin. Peningkatan ekspresi gen dan alkalin fosfatase adalah berkadar dengan dos rawatan vitamin E pada titisan sel mesenkima tulang. Kajian terdahulu yang dibuat oleh Brooks et al. 2011 menunjukkan tokotrienol (α -, δ - dan γ -) berjaya mengurangkan penghasilan mendapan kalsium dan asid fosfatase rintang tartrat (TRAP) pada sampel ujian pra-osteoklas (Brooks et al 2011). Kajian yang dibuat oleh Soelaiman et al. 2018 menunjukkan γ - dan δ -tokotrienol meningkatkan ketebalan trabekular dan kekuatan biomekanikal perancah tulang (Ima-Nirwana et al.2018). Xu et al. pula melaporkan penggunaan dos γ -tokotrienol yang rendah mampu menggalakkan fungsi sel osteoblas Sel selanjara MC3T3-E1 (Xu et al. 2018). Dalam satu kajian yang lain mendapati campuran γ - dan δ -tokotrienol merangsang aktiviti osteogenik dengan mengaruhkan pengekspresan gen (OSX, COL1 α 1, ALP, OCN) dan meningkatkan pembentukan aktiviti ALP dan kolagen jenis 1 (Wan Hassan et al. 2018). Tokotrienol juga telah menunjukkan sifat antioksidanya dalam kajian *in vitro*. Penemuan ini disokong daripada hasil kajian Nizar et al (2011) melaporkan γ -tokotrienol mencegah apoptosis pada sel osteoblas yang diaruhkan dengan hidrogen peroksida. Dalam kajian tersebut mendapati rawatan γ -tokotrienol dengan dos yang tinggi (290 μ m) menyebabkan kematian dan kesan toksik pada sel tetapi pada dos yang rendah (1 μ m) berjaya melindungi sel osteoblas daripada kesan hidrogen peroksida dan membantu pertumbuhan sel dengan lebih baik. Kajian lanjutan yang dibuat juga mendapati rawatan sel osteoblas dengan dos yang rendah (1 μ m) membantu sel osteoblas daripada tekanan oksidatif (Manan et al. 2012).

Walau bagaimanapun sehingga kini belum ada lagi kajian secara *in vitro* yang dibuat dapat mengenalpasti isomer vitamin E secara 3D yang memberi kesan terhadap pembentukan tulang. Kebanyakan laporan penyelidikan melaporkan campuran

tokotrienol lebih memberi kesan terhadap kesihatan tulang berbanding tokoferol. Kajian *in vivo* menunjukkan γ -tokotrienol memberikan kesan perlindungan tulang yang lebih tinggi berbanding isomer vitamin E yang lain. Sehubungan itu, kajian ini di buat bagi mengenalpasti isomer vitamin E yang terbaik dalam pembentukan tulang menggunakan kajian secara *in vitro* secara 3D di dalam perancah tulang. Dalam kajian ini pengkaji memilih pengkulturan secara 3D kerana ini menyediakan mikrosekitaran yang menyerupai pembentukan tulang. Pihak pengkaji mencadangkan untuk memilih tulang asli daripada femur lembu kerana tulang ini menghampiri keadaan fisiologi tulang dalam badan manusia di mana sel osteoblas boleh berinteraksi dengan tulang perancah. Dalam kajian ini juga, pengkaji bukan sahaja melihat kesan isomer vitamin E ke atas sel osteoblas tetapi melihat kesan osteoblas ke atas tulang secara langsung. Malahan melihat aktiviti metabolisme tulang dengan lebih tepat. Cadangan pemilihan bahagian trabekular kerana struktur span yang dimiliki oleh tulang tersebut dengan nisbah keluasan yang lebih besar untuk perlekatan sel. Tambahan pula kawasan tersebut mempunyai kadar pemodelan semula tulang yang lebih tinggi berbanding bahagian tulang yang lain.

BAB III

BAHAN DAN KAEDAH

3.1 BAHAN KAJIAN

3.1.1 Graf Tulang

Tulang femur lembu digunakan dalam kajian ini sebagai sampel kajian. Tulang ini diperolehi daripada pusat penyembelihan lembu di Shah Alam. Dua femur lembu dibeli dan dibekukan selama 48 jam di dalam peti sejuk beku -80°C .

3.1.2 Rawatan Vitamin E

Isomer tokotrienol yang berbeza iaitu α -tokotrienol, β -tokotrienol, δ -tokotrienol, γ -tokotrienol serta α -tokoferol digunakan dalam kajian. Isomer tokotrienol yang berbeza iaitu α -tokotrienol, β -tokotrienol, δ -tokotrienol dan γ -tokotrienol diperolehi daripada American River Nutrition (Hadley, USA). Manakala α -tokoferol dibeli daripada pengeluar Cayman Chemical, Amerika Syarikat

3.1.3 Sel Osteoblas

Sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 digunakan sepanjang kajian ini dibuat. Sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 (CRL-11372) dibeli daripada *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, Amerika Syarikat). Ciri sel ini disenaraikan berdasarkan Jadual 3.1.

Jadual 3.1 Ciri sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 serta keperluan pertumbuhan sel

Ciri sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 serta keperluan pertumbuhan	
Organism	<i>Homo sapiens</i> daripada sumber manusia
Tisu	Tulang
Jenis sel	Sel osteoblas normal yang mengandungi jujukan virus SV40
Keperluan pertumbuhan	Media DMEM/F12 (Gibco @ Invitrogen, USA); 10% bovine serum serta 1% penicillin-Streptomycin

3.1.4 Plasma

Dalam kajian ini, plasma digunakan untuk mendapatkan fibrin. Sampel darah diperolehi daripada penderma yang sihat. Darah dikumpulkan di dalam tiub mengandungi antigumpalan. Darah kemudian diempar dengan kelajuan 3500 rpm selama 10 minit untuk mendapatkan plasma. Prosedur ini mendapat kelulusan daripada Jawatankuasa Etika Universiti Kebangsaan nombor kelulusan UKM 1.5.3.5/244/FF-2014-187.

3.2 BAHAN KIMIA DAN REAGEN

3.2.1 Bahan Kimia Penyediaan Tulang Perancah Lembu

Jadual 3.2 menunjukkan senarai bahan kimia bagi penyediaan perancah tulang lembu

Jadual 3.2 Senarai bahan kimia penyediaan perancah tulang lembu

Senarai Bahan Kimia	Jenama	Negara Pengeluar
Asid etilin diamin tetrasetik (EDTA)	HmBG Chemicals	Jerman
Formaldehid 37% (sodium fosfat monobes	J.T Baker	Amerika Syarikat
sodium hidroksida (Merck, Jerman).	Sigma	Amerika Syarikat
	Merck	Jerman

3.2.2 Bahan Kimia Untuk Pengkulturan Sel Osteoblas Fetus, hFOB 1.19

Jadual 3.3 menunjukkan senarai bahan kimia bagi pengkulturan sel osteoblas hFOB 1.19

Jadual 3.3 Senarai bahan kimia pengkulturan sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19

Senarai Bahan Kimia	Jenama	Negara Pengeluar
Campuran 1:1 Ham's F12 Media Dulbecco Modifikasi Media Eagle bersama 2.5 mM L-glutamine	Gibco	Amerika Syarikat
Antibiotik-antimikotik Trypsin 2.5%, Serum bovin fetus (FBS)	Gibco	Amerika Syarikat
Penimbang Fosfat	Gibco	Amerika Syarikat
Dimetil sulfoksida	Sigma Aldrich	Amerika Syarikat

3.2.3 Bahan Kimia dan Reagen Untuk Pengiraan Sel

Jadual 3.4 menunjukkan senarai bahan kimia bagi pengkulturan sel osteoblas fetus manusia, hFOB 1.19

Jadual 3.4 Senarai bahan kimia pengiraan sel

Senarai Bahan Kimia/Reagen	Jenama	Negara Pengeluar
Trypan Biru 0.4%	Gibco	Amerika Syarikat
Sisip kaca pakai buang	Thermo Fisher	Amerika Syarikat

3.2.4 Bahan Kimia Untuk Penyediaan Gel Agarosa

Jadual 3.5 menunjukkan senarai bahan kimia untuk penyediaan gel agarosa sebagai acuan.

Jadual 3.5 Senarai bahan kimia penyediaan gel agarosa

Senarai Bahan Kimia/Reagen	Jenama	Negara Pengeluar
Serbuk agarosa	Sigma	Amerika Syarikat

3.2.5 Bahan Kimia Asai Viabiliti Sel

Untuk menentukan kepekatan optimum rawatan asai viability sel dibuat. Jadual 3.6 menunjukkan senarai kit bagi asai viabiliti sel.

Jadual 3.6 Senarai bahan kimia viabiliti sel

Senarai Bahan Kimia/Reagen	Jenama	Negara Pengeluar
kit komersial CellTiter 96® Aques Non-Radioactive Cell Prolifera- tion Assay (MTS) {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3- karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazolium (MTS).	Promega Sigma Aldrich	Amerika Syarikat Amerika Syarikat

3.2.6 Penyediaan Tulang Tak Ternyakhkalsium

Jadual 3.7 menunjukkan senarai bahan kimia bagi penyediaan tulang tak ternyakhkalsium

Jadual 3.7 Senarai bahan kimia bagi penyediaan tulang tak ternyakhkalsium

Senarai Bahan Kimia/Reagen	Jenama	Negara Pengeluar
Penimbal Neutral formalin 10%	J.T Baker	Amerika Syarikat
Etanol 70%	HMBG	Malaysia
Etanol 80%	HMBG	Malaysia
Etanol 95%	HMBG	Malaysia
Etanol 100%	HMBG	Malaysia
Osteobed Bone Embedding Kit	Polysciences Inc	Jerman

3.2.7 Penyediaan Pewarnaan von Kossa

Jadual 3.8 menunjukkan senarai bahan kimia bagi pewarnaan von Kossa.

Jadual 3.8 Senarai bahan kimia pewarnaan von Kossa

Senarai Bahan Kimia/Reagen	Jenama	Negara Pengeluar
Etanol 70%	HMBG	Malaysia
Etanol 96%	HMBG	Malaysia
Etanol 100%	HMBG	Malaysia
1% perak nitrat	Sigma Aldrich	Amerika Syarikat
2.5% natrium tiosulfat	Sigma Aldrich	Amerika Syarikat
Dietil eter	Sigma Aldrich	Amerika Syarikat
DPX	Merck	Jerman

3.2.8 Penyediaan Tulang Nyahkalsium

Jadual 3.9 menunjukkan senarai bahan kimia bagi penyediaan tulang nyahkalsium.

Jadual 3.9 Senarai bahan kimia penyediaan tulang nyahkalsium

Senarai Bahan Kimia/Reagen	Jenama	Negara Pengeluar
Etanol 70%	HMBG	Malaysia
Etanol 80%	HMBG	Malaysia
Etanol 95%	HMBG	Malaysia
Etanol 100%	HMBG	Malaysia
Larutan Penimbal neutral 10%	Merck	Jerman
Formal dehyde (37%-40%)	Merck	Jerman
Sodium monobes	Sigma	Amerika Syarikat
Sodium hidroksida	Merck	Jerman

3.2.9 Penyediaan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Jadual 3.10 menunjukkan senarai bahan kimia bagi pewarnaan hematoxilin dan eosin bagi sampel perancah tulang nyahkalsium.

Jadual 3.10 Senarai bahan kimia pewarnaan hematoxilin dan eosin

Senarai Bahan Kimia/Reagen	Jenama	Negara Pengeluar
Etanol 70%	HMBG	Malaysia
Etanol 96%	HMBG	Malaysia
Etanol 100%	HMBG	Malaysia
Kit hematoxylin	Merck	Jerman

3.2.10 Pengukuran Penanda Biokimia Menggunakan Asai Imunoserap Terangkai Enzim (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)

Jadual 3.11 menunjukkan senarai kit bagi asai penanda biokimia.

Jadual 3.11 Senarai kit penanda biokimia

Senarai Bahan Kimia/Reagen	Jenama	Negara Pengeluar
kit komersial bagi Aktiviti ALP	Elabscience	China
Kit komersial Osteokalsin	Elabscience	China
Penimbal Fosfat	Gibco	Amerika Syarikat

3.2.11 Penyediaan Sampel Untuk Pengimbasan Mikroskop Elektron

Jadual 3.12 menunjukkan senarai bahan kimia bagi penyediaan sampel perancah tulang lembu untuk pengimbasan elektron mikroskop.

Jadual 3.12 Senarai bahan kimia untuk pengimbasan mikroskop elektron

Senarai Bahan Kimia/Reagen	Jenama	Negara Pengeluar
Etanol 70%	HMBG	Malaysia
Etanol 96%	HMBG	Malaysia
Etanol 100%	HMBG	Malaysia
4% Glutaraldehid	Merck	Jerman

3.2.12 Bahan Kimia Untuk Imbasan Tomografi Berkomputer (CT Scan)

Larutan salina penimbal fosfat (PNS) (Sigma Aldrich, Amerika Syarikat) dihasilkan dengan melarutkan kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) (Sigma Aldrich, Amerika Syarikat).

3.3 PENYEDIAAN MEDIA, LARUTAN DAN RAWATAN

3.3.1 Penyediaan Media Kultur Lengkap (CCM)

Media kultur lengkap disediakan dengan mencampurkan 10% serum bovin fetal dan 1% antibiotik-antimikotik (AA) di mana prosedur ini perlu dilakukan di dalam kabinet kultur tisu. Penyediaan media penuh dibuat dengan mencampurkan 45 mL media DMEM F12 bersama-sama 1 mL antibiotik-antimikotik (AA) dan 5 mL serum bovin fetal (FBS).

3.3.2 Penyediaan EDTA (Asid etilena dwiaminotetraasetik) dan Larutan Formalin Penimbal Neutral 10%

Larutan formalin penimbal neutral 10% disediakan terlebih dahulu di mana 100 mL formaldehid dicampurkan dengan 900 mL air suling. Sebanyak 18.6 g natrium fosfat monobes (NaH_2PO_4 , H_2O) dan 4.2 g natrium hidroksida (NaOH) ditimbang dan dilarutkan di dalam campuran larutan formaldehid dan air suling. Setelah kesemua larutan terlarut dengan sempurna, pH larutan ditetapkan pada 7.2 sehingga 7.4. Setelah itu, 5.5 g EDTA dicampurkan kedalam 100 mL larutan formalin penimbal neutral. Larutan dikacau dengan pengacau magnetik bagi memastikan kesemua bahan terlarut dengan sempurna.

3.3.3 Penyediaan Fibrin Daripada Plasma Penderma

Sampel darah yang diperolehi daripada penderma dikumpulkan di dalam tiub darah mengandungi antigenapan EDTA. Sample darah kemudiannya diempar pada kelajuan 3500 rpm selama 10 minit. Sampel plasma yang diperolehi dikumpulkan di dalam tiub darah kosong dan disimpan di dalam peti sejuk beku -80°C bagi memastikan kesegaran

dan kestabilan plasma untuk digunakan sewaktu pengkulturan sel di dalam perancah tulang.

3.4 ALAT RADAS

3.4.1 Alat Radas Untuk Penyediaan Perancah Tulang Lembu.

Proses fiksasi tulang lembu: Alat-alat radas yang digunakan ialah pengektrak reflux, botol schott Duran 1000ml (Mainz, Jerman), Kelalang bulat 1000ml (Pyrex, Amerika Syarikat) oven (Memmert, Jerman), penimbang elektronik (Mettler Toledo, Amerika Syarikat) botol schott 250ml, 500ml dan 1L (Schott Duran, Jerman), pengacau magnetik (Thermolyne, Amerika Syarikat) pH meter (Mettler Toledo, Amerika Syarikat),

3.4.2 Pensterilan

Mesin autoklaf (Tomy ES 315, Jepun), pita autoklaf, kerajang aluminium, botol kaca 1L, 500 mL, 100 mL dan tiub mikro emparan.

3.4.3 Pengkulturan Sel

Kabinet pengaliran laminar vertical kelas II, mesin inkubator karbon dioksida (RS Biotech, United Kingdom). Kelalang tisu kultur bertapak rata 25cm² dan 75 cm² (Falcon BD, Amerika Syarikat) mikropipet berisipadu 1 mL, 100 µL, dan 10 µL (Eppendorf, Jerman) tip isipadu 1 mL, 100 µl dan 10 µL (Eppendorf, Jerman) pipet plastik steril pakai buang 3 ml (Falcon BD, Amerika Syarikat). Tangki rendaman air (Memmert, Jerman) meter pH (Bante, China), pengacau bermagnet (Thermolyne, Amerika Syarikat), penggempar (Eppendorf, Jerman) kabinet keselamatan biologi kelas II; BSC-II (Telstar, Sepanyol) inkubator karbon dioksida Galaxy ® S (News Brunswick Scientific, Amerika Syarikat), mikroskop berbalik cahaya model Olympus CK2 (Olympus, Jepun), telaga -96, 24, 15 dan 50 ml tiub steril (Eppendorf, Jerman), tiub steril mikro emparan dengan muatan 1.5 ml dan 2.0 ml (Tarsons, India), kelalang tapak rata 75 cm² (Falcon, Amerika Syarikat), penggempar meja (Eppendorf, Jerman) pembaca plat mikro model (Tecan,

Austria), pengempar mikro sejuk (Beckman Coulter, Jerman) dan vorteks (Smart Scientific, Korea).

3.4.4 Pengiraan Sel

Mesin pengiraan sel automatik (Life Technologies Countess II FL Cell Counter, Jepun).

3.4.5 Penyediaan Tulang Homogenat Untuk Kegunaan Asai

Pengempar mikro bersuhu (Beckman Coulter, Amerika Syarikat), mikropipet berisipadu 10, 200 dan 1000 μL (Eppendorf, Jerman), tiub emparan dengan muatan 15 mL dan alat penimbang elektronik Mettler AE240 (Mettler Instrument, Switzerland).

3.4.6 Pengukuran Viabiliti Sel hFOB 1.19

96-telaga plat mikrotiter, tiub mikro emparan (Eppendorf, Jerman) tip berisipadu 10, 200 dan 1000 μL , mikropipet berisipadu 10, 200 dan 1000 μL (Eppendorf, Jerman) dan mesin mikro pembaca mikroplat (Tecan Sunnyvale, AS).

3.4.7 Pengukuran Aktiviti Alkaline Fosfatase dan Osteokalsin

96-telaga plat mikrotiter, tiub mikro emparan 10, 200 dan 1000 μL (Eppendorf, Jerman) tip berisipadu 10, 200 dan 1000 μL , mikropipet berisipadu 10, 200 dan 1000 μL (Eppendorf, Jerman), mesin penghancur mikro manik, mesin mikro pembaca mikroplat (Thermo Scientific) dan Tecan (Sunnyvale, Amerika Syarikat).

3.4.8 Pengimbasan Mikroskop Elektron

Mesin saduran emas dan mikroskop elektron, Zeiss Evo MA 10.

3.4.9 Pengukuran Imbasan Tomografi Berkomputer (CT Scan)

Pengukuran dibuat menggunakan peralatan Micro CT Sky Scan 1076 keluaran SkyScan, Kontich, Belgium. Analisa histomorfometri tomografi dibuat menggunakan perisian NRecon (V1.6.10.4, Skyscan Belgium). Pengkonturan dibuat secara separa automatik menggunakan perisian CTAn (V1.16.1.0 +, SkyScan, Belgium).

3.4.10 Penyediaan Slaid Kaca Tisu Tulang

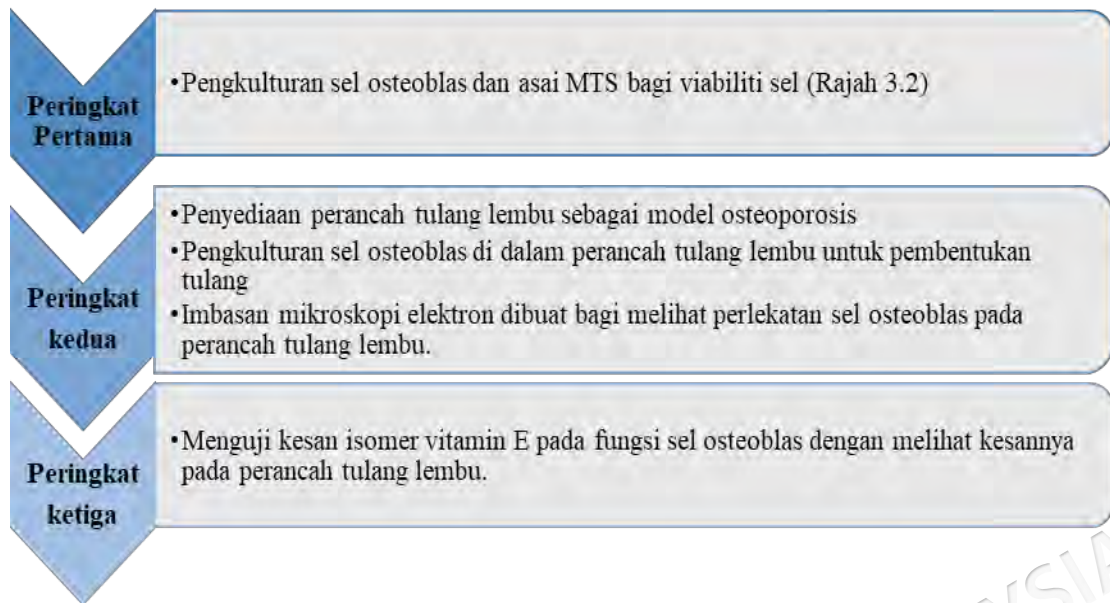
Mesin mikrotom (Leica RM2235, Amerika Syarikat), pisau mikrotom Leica 818, Amerika Syarikat, slaid kaca mikroskopik dan mikroskop cahaya (Olympus CX31, Jepun).

3.4.11 Penentuan Histomorfometrik Tisu Tulang

Mikroskop cahaya (Nikon Eclipse 80i, Jepun, Kamera (Q-imaging Micropublisher 5.0, Kanada) dan komputer dengan perisian pengalisan imej Image-Pro Plus versi 5.0.2.9.

3.5 PERINGKAT KAJIAN

Kajian ini merupakan kajian *in vitro* menggunakan titisan sel osteoblas hFOB 1.19 yang disuntikkan ke dalam perancah tulang lembu dan dirawat dengan isomer vitamin E. Isomer vitamin E seperti α -, β -, γ - dan δ -tokotrienol disumbangkan oleh pihak penaja iaitu American River Nutrition. Manakala isomer α -tokoferol dibeli daripada pengeluar Cayman. Kajian in terbahagi tiga peringkat. Peringkat pertama adalah pengkulturan secara 2D manakala peringkat kedua dan ketiga pengkulturan statik dibuat di dalam perancah tulang lembu secara 3D (Rajah 3.1).



Rajah 3.1 Gambaran peringkat kajian kesan isomer vitamin E secara *in vitro*

3.5.1 Peringkat Pertama: Pengkulturan Sel Osteoblas dan Ujian Viabiliti.

Pada peringkat pertama, titisan sel osteoblas hFOB 1.19 yang dibeli daripada ATCC dikultur di dalam kelalang tapak rata 75 cm². Pada peringkat pertama sel osteoblas hFOB 1.19 yang telah diterima dikultur terlebih dahulu sehingga pemindahan sel ke- 10. Untuk simpanan, stok sel osteoblas akan disimpan di dalam cecair nitrogen untuk memastikan sel terus kekal hidup. Pada peringkat ini, pengkaji menjalankan ujian asai MTS bagi melihat viabiliti sel dan memilih kepekatan isomer vitamin E yang sesuai untuk kajian. Berdasarkan hasil keputusan asai MTS, kepekatan rawatan isomer vitamin E terhadap sel osteoblas telah dikenalpasti. Kepekatan tersebut akan digunakan di dalam semua rawatan (Rajah 3.1).

3.5.2 Peringkat Kedua: Penyediaan Tulang Perancah Dan Pengujian Perlekatan Sel Osteoblas Pada Perancah Tulang Lembu

Pada peringkat kedua tulang perancah disediakan. Tulang lembu yang dibeli daripada Pusat Penyebelihan Shah Alam akan dinyahkalsium dan dipotong kecil dengan dimensi 10 mm x 10 mm x 5mm. Setelah itu, tulang tersebut akan dikering beku dan disteril terlebih dahulu sebelum digunakan dalam kajian. Pada peringkat ini, sel osteoblas yang telah mencapai kepadatan sel 90% disuntik masuk ke dalam perancah tulang lembu. Kemudian imbasan melalui mikroskop elektron dibuat setelah 7 hari pengeraman bagi

melihat keupayaan sel yang melekat pada sel osteoblas. Sekiranya sel osteoblas berjaya melekat maka peringkat ketiga dapat diteruskan (Rajah 3.1).

3.5.3 Peringkat Ketiga : Pengujian Kesan Rawatan Isomer Vitamin E

Pada peringkat ketiga kesemua perancah yang dirawat dengan isomer vitamin E dan dieram selama 21 hari. Perancah tulang akan dirawat bermula pada hari kedua sehingga hari ke 21. Perancah tulang akan dituai pada hari ke 7 untuk pemeriksaan mikroskop elektron. Perancah tulang juga akan diasai untuk ujian penanda biokimia dimana pengukuran osteokalsin dan asai aktiviti alkalin fosfatase dibuat. Perancah tulang lembu yang dirawat juga diimbas melalui tomografi berkomputer (*CT scan*). Histomorfometri berstruktur tulang dilihat setelah 21 hari rawatan. Kumpulan rawatan dan kumpulan rawatan disediakan berdasarkan ringkasan Jadual 3.13.

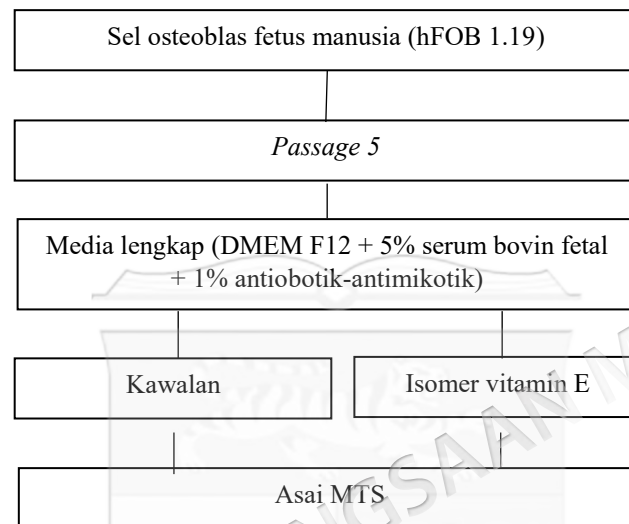
Jadual 3.13

Jadual pembahagian kumpulan rawatan perancah tulang lembu

Kumpulan	Rawatan
PC	Kawalan positif (Perancah tulang asli (<i>native</i>))
NC	Kawalan negatif (Perancah tulang lembu nyahkalsium yang disuntik dengan sel osteoblas)
OB	Tulang osteoporotik (Perancah tulang lembu yang nyahkalsium tanpa media)
AP	Perancah NC yang dirawat dengan α -tokoferol
AT	Perancah NC yang dirawat dengan α -tokotrienol
BT	Perancah NC yang dirawat dengan β -tokotrienol
GT	Perancah NC yang dirawat dengan γ -tokotrienol
DT	Perancah NC yang dirawat dengan δ -tokotrienol

3.6 REKA BENTUK KAJIAN

Terlebih dahulu kepekatan optimum isomer vitamin E ditentukan melalui asai MTS untuk viabiliti sel (Rajah 3.2). Apabila kepekatan telah ditentukan, kepekatan tersebut digunakan dalam keseluruhan kajian ini iaitu melibatkan pembentukan tulang (Rajah 3.3).



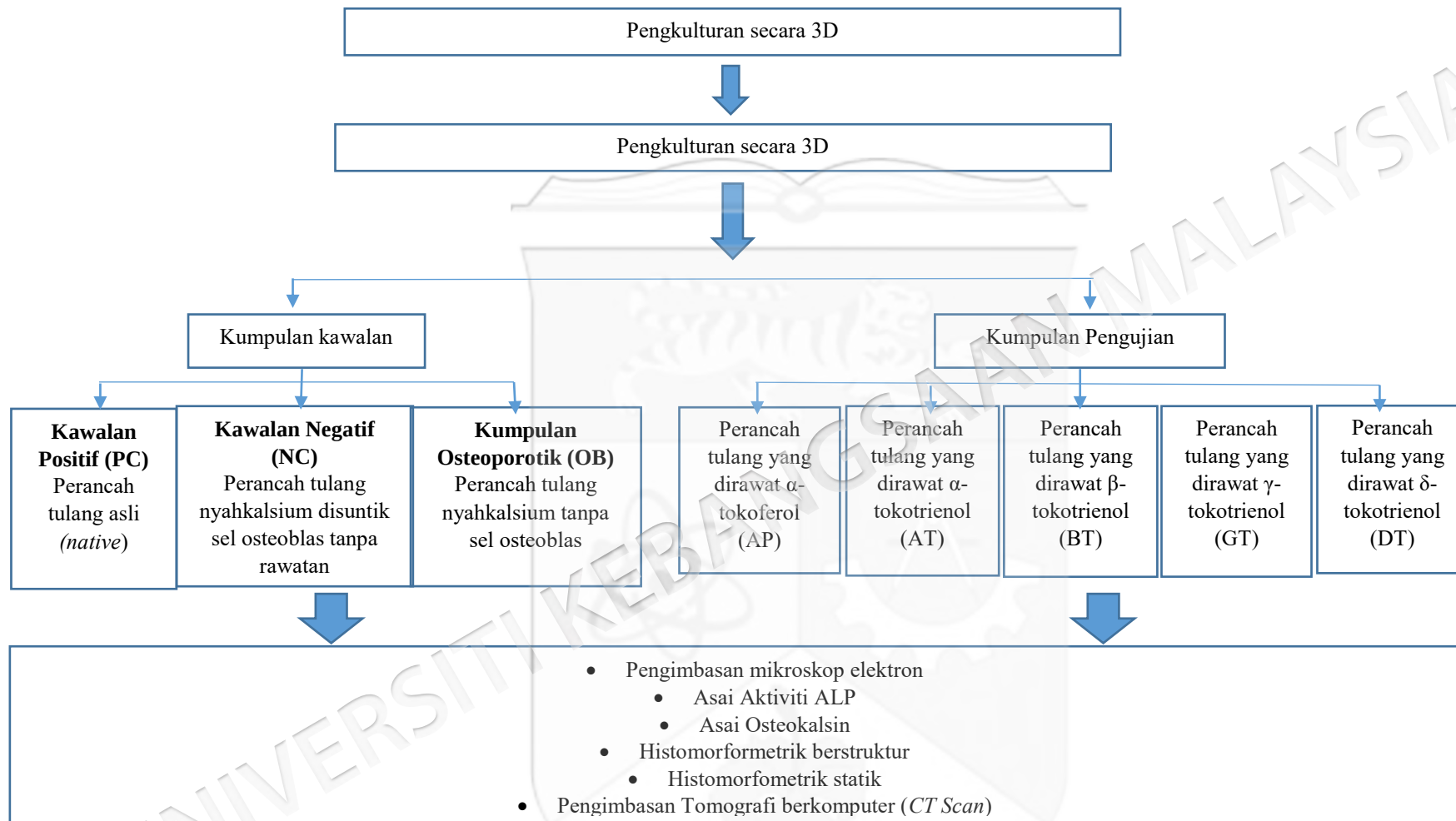
Rajah 3.2 Penentuan kepekatan optimum isomer vitamin E terhadap sel osteoblas hFOB 1.19

Rajah 3.2 menunjukkan sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 pada *passage* ke-5 dibahagikan kepada dua kumpulan iaitu kumpulan kawalan dan rawatan isomer vitamin E. Kumpulan kawalan mengandungi etanol. Kumpulan isomer vitamin E terdiri daripada α -, β -, γ -, δ - tokotrienol dan α -tokoferol yang berkepekatan 1 sehingga 1000 nM. Asai MTS dilakukan ke atas kesemua kumpulan ini. Berdasarkan daripada asai MTS, kepekatan efektif isomer vitamin E terhadap sel osteoblas fetus manusia telah dikenalpasti. Kepekatan efektif tersebut digunakan dalam penentuan pembentukan tulang.

Rajah 3.3 menunjukkan pengkulturan secara 3D dibuat dimana sel osteoblas fetus manusia akan disuntik masuk kedalam perancah tulang lembu. Perkulturan dibuat bagi perancah tulang lembu akan dirawat dengan isomer vitamin E selama 21 hari. Kajian melibatkan 3 kumpulan kawalan serta 5 kumpulan rawatan dengan kepekatan isomer vitamin E yang sama. Bagi melihat perlekatan sel osteoblas pada perancah tulang lembu, pengimbasan mikroskop elektron dijalankan. Bagi melihat pembentukan tulang, aktiviti

ALP serta aras osteokalsin dibuat menggunakan keadah asai immunoserap terangkai enzim (ELISA). Histomorfometri berstruktur tulang melibatkan pewarnaan von Kossa dan sampel perancah tidak dinyahkalsium. Manakala histomorfometrik tulang statik, sampel perancah akan dinyahkalsium dan pewarnaan hematoksilin dan eosin akan dibuat. Pengimbasan imej topografi secara 3D dibuat menggunakan pengimbasan tomografi berkomputer (*CT Scan*) (Rajah 3.3).





Rajah 3.3 Reka bentuk kajian

3.7 KAEDAH KAJIAN

3.7.1 Pensterilan Alat Radas

Alat radas yang digunakan sepanjang proses pengkulturan sel perlu berada dalam keadaan bersih dan steril. Alat radas yang diulang pakai perlu dibersihkan dan disteril. Alat radas seperti pisau pemotong, forcep, botol schott dibasuh dan dikeringkan pada rak pengering. Setelah kering, radas akan dimasukkan di dalam plastik khas steril dan ditanda dengan pita autoklaf. Alat radas sedia disteril di dalam alat dandang stim pada suhu 121°C dengan tekanan 100 kPa selama 15 minit.

3.7.2 Penyediaan perancah tulang lembu

i. Pemotongan tulang untuk dijadikan perancah

Tulang femur yang diperolehi daripada pusat sembelihan haiwan dibekukan di dalam freezer -80°C . Selepas semalaman, tulang femur pada bahagian trabekular dipotong secara melintang dengan ketebalan 10mm dengan menggunakan mesin pemotong tulang. Hirisan tulang lembu kemudiannya direndam di dalam 100% etanol selama lebih kurang 2 jam bagi membuang sisa lemak dan sebarang residual daripada sumsum tulang (Rajah 3.4).

ii. Proses Nyahkalsium Tulang

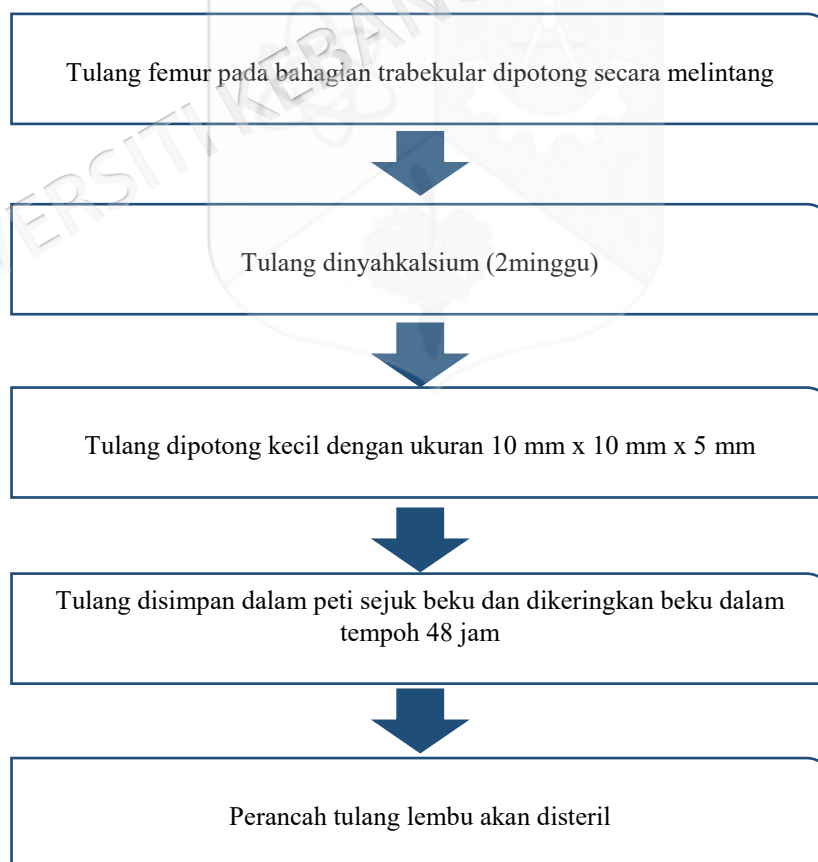
Setelah itu hirisan tulang tersebut dinyahkalsium dengan menggunakan 0.6 N asid hidroklorik bagi menyingkirkan kalsium (Rajah 3.4). Hirisan tulang direndam selama empat hari, bagi memastikan tulang tersebut boleh dipotong kecil. Hirisan tulang yang telah lembut dipotong dalam bentuk segi empat sama dengan dimensi ukuran 10mm x 10mm x 5mm (panjang x lebar x tinggi). Tulang yang telah siap dipotong perlu dibilas dengan penimbal fosfat bagi menyingkirkan residual asid untuk digunakan sebagai perancah tulang lembu. Tulang yang telah dipotong dibilas, dikeringkan dan disimpan di dalam peti sejuk beku -80°C selama dua minggu.

iii. Kering beku

Setelah dua minggu, perancah tulang lembu tersebut disejukkan. Perancah tulang lembu dikeluarkan dan dikering beku dengan menggunakan mesin kering beku (Labconco, Amerika Syarikat). Perancah tulang lembu dikeringkan beku selama 48 jam (Rajah 3.4).

iv Pensterilan

Perancah tulang lembu yang telah dikeringkan disimpan di dalam botol Schott. Perancah tulang tersebut perlu melalui proses pensterilan bagi memastikan perancah bebas daripada sebarang kontaminasi. Botol schott yang mengandungi perancah tulang lembu ditampal dengan pita autoklaf dan disteril. Tulang disteril di dalam alat dandang stim pada suhu 121°C dengan tekanan 100 kPa selama 15 minit. Perancah tulang yang telah disterilkan disimpan di tempat kering dan ditutup ketat.



Rajah 3.4

Proses penyediaan perancah tulang lembu

3.7.3 Penyediaan Acuan 5% Gel Agarosa

Sebanyak 5 gram agarosa ditimbang dan dicampurkan ke dalam 100 ml larutan penimbal dan di masukkan ke dalam ketuhar mikro gelombang selama 2 minit. Kemudian larutan agarosa dituangkan ke dalam plat mikroplat 6 telaga. Larutan agarosa dituangkan ke dalam telaga sehingga $\frac{3}{4}$ penuh. Kemudian larutan tersebut dibiarkan seketika untuk membeku. Setelah agarosa membeku, potongan dibuat ditengah-tengah telaga. Potongan dibuat dengan dimensi 15 mm x 15 mm x 5 mm. Acuan yang telah dibuat potongan bagi setiap telaga boleh sedia untuk ditenhkan sel. Penyediaan agarosa perlu dibuat dalam keadaan steril.

3.7.4 Penyediaan Pengumpulan Fibrin

Plasma yang telah dikumpulkan dikeluarkan daripada sejuk beku. Kemudian plasma tersebut direndam seketika di dalam di dalam tangki rendaman air bersuhu 37°C selama lebih kurang 1-2 minit. Setelah itu campuran plasma ditambahkan dengan 0.5 M kalsium klorida dah dicampur dengan sebatu.

3.7.5 Pengkulturan Sel

i. Penyahbekuan sel

Sel osteoblas fetus manusia, hFOB 1.19 diperolehi daripada ATCC. Sel yang diterima perlu dicairkan dengan mengocaknya secara perlahan-lahan di dalam tangki rendaman air yang bersuhu 37°C. Sel dicairkan dalam tangki rendaman air selama 2 minit dan dikeluarkan segera bagi menjamin peratusan viabiliti sel. Vial perlu dikontaminasi dengan menggunakan semburan 70% etanol. Setelah itu, sel di dalam vial dikeluarkan keseluruhannya dan dimasukkan segera ke dalam tiub falkon yang mengandungi 9.0 mL CCM. Sel tersebut diemparkan ke dalam mesin pengempar pada kelajuan 3000 rpm selama 5 minit. Setelah itu, supernatan dibuang dan palet disuspensi dengan menggunakan CCM. Sel tersebut disubkultur ke dalam kelalang tisu kultur bertapak rata 75cm². Sel akan dieramkan di dalam inkubator yang mengandungi 5% karbon dioksida dan bersuhu 37°C.

ii. Subkultur sel

Sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 akan tumbuh melekat pada dasar permukaan kelalang bertapak rata. Setelah pertumbuhan sel mencapai kepadatan 80-95% proses subkultur dilakukan. Media kultur lengkap yang berada di dalam kelalang dikeluarkan sepenuhnya ke dalam tiub pengempal 2.5 ml dan akan digunakan semula bagi proses menghentikan tindakan Tripsin-EDTA. Sel dibilas dengan larutan penimbal PBS sebanyak tiga kali. Kemudian larutan Tripsin EDTA ditambah sebanyak 1 ml ke dalam kelalang untuk menanggalkan sel yang melekat pada dasar permukaan kelalang. Sel yang telah bercampur sebatu dengan Tripsin EDTA akan dieram selama 3 minit di dalam inkubator CO₂. Setelah semua sel tertanggal daripada dasar kelalang, CCM yang telah digunakan dimasukkan semula ke dalam kelalang bagi menghentikan tindak balas Tripsin-EDTA. Keseluruhan larutan dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam tiub falcon berisipadu 15mL. Kemudian larutan yang mengandungi sel diemparkan pada kelajuan 3000 rpm selama 5 minit. Supernatan dikeluarkan sepenuhnya dan pelet yang tinggal disuspensi semula dengan 2 mL media lengkap (CCM) dan disubkultur ke dalam kelalang kon yang mengandungi 10 mL CCM.

iii. Pembekuan Sel dan Penyimpanan Stok Sel

Sel yang telah mencapai kepadatan 80-95% akan ditanggalkan daripada dasar kelalang menggunakan larutan tripsin-EDTA. Sel kemudian dibilas dengan larutan penimbal PBS sebanyak tiga kali. Kemudian larutan Tripsin-EDTA akan ditambah sebanyak 1 ml ke dalam kelalang untuk menanggalkan sel yang melekat pada dasar permukaan kelalang. Sel yang telah bercampur sebatu dengan Tripsin EDTA dieram selama 3 minit di dalam inkubator CO₂. Sel yang terampai akan dicampur dengan CCM yang digunakan bagi menghentikan tindak balas Tripsin-EDTA. Keseluruhan larutan dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam tiub falcon berisipadu 15mL. Kemudian larutan yang mengandungi sel diemparkan pada kelajuan 3000 rpm selama 5 minit. Supernatan akan disingkirkan dan pelet yang tinggal disuspensi dengan media kultur lengkap bersama campuran 10% serum bovin dan dimetil sulfoksida (DMSO). Sel kemudian dipindahkan ke dalam tiub mikro sejuk beku dan ditutup rapat, dilabel dan disejukkan pada suhu -80°C. Untuk simpanan lama sel perlu dipindahkan ke dalam tangki cecair nitrogen.

3.7.6 Pengiraan Sel

Pengiraan sel dilakukan dengan penggunaan tripan biru. Sebanyak 20 μL suspensi sel dimasukkan ke dalam tiub mikro emparan dan dicampur bersama dengan 20 μL pewarna tripan biru. Campuran disebatikan dengan menggunakan vortex pada kelajuan minimum bertujuan untuk mencampurkan sel dan tripan biru. Sebanyak 10 μL campuran sel di masukkan ke tepi sisip kaca slaid hemositometer dan dibiarkan memenuhi ruang permukaan hemositometer. Slaid hemositometer di baca menggunakan mesin Automatik Bacaan Kiraan Sel (Life Technologies Countess II FL Cell Counter). Sel boleh diamati pada skrin mesin dengan sel yang hidup berwarna pendarfluor hijau manakala sel yang mati akan menyerap warna trepan biru dan kelihatan berwarna biru gelap. Kepekatan sel dapat diperolehi dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kepekatan sel (sel/ML)} = \frac{\text{Jumlah sel dalam empat pepenjuru} \times \text{faktor pencairan} \times 10^4}{\text{Bilangan pepenjuru yang digunakan}}$$

Faktor pencairan sel ialah dua apabila isipadu ampaian sel dan larutan tripan biru dicampur dalam nisbah 1:1. Faktor pencairan boleh ditingkatkan dengan meningkatkan isipadu tripan biru jika bilangan sel dalam ampaian sel adalah terlalu tinggi. Manakala 1×10^4 mL dalam rumus tersebut mewakili isipadu larutan yang memenuhi ruang satu penjuru.

3.7.7 Penyediaan dan Rawatan Isomer Vitamin E

Etanol digunakan sebagai pelarut untuk tokotrienol dan tokoferol. Stok utama disediakan dengan menimbang 5 mg bagi setiap isomer (α -, β -, γ - dan δ -tokotrienol bersama α -tokoferol) dan dilarutkan bersama 1mL etanol. Kedua campuran boleh disimpan sebagai stok utama dan disimpan dalam tempoh satu bulan. Untuk rawatan 45 μL stok utama akan dicampurkan dengan 60 μL serum dan dibiarkan semalaman di dalam inkubator. 24 jam selepas itu, 105 μL 50% etanol ditambah bersama 90 μL CCM ke dalam campuran

isomer yang telah diaktifkan. Kaedah dibuat berdasarkan kaedah yang dibuat oleh Makpol et al. 2011.

3.7.8 Pengukuran Asai Viabiliti Sel

Kit komersial cell titer 96® *Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTS) (Promega, AS) digunakan untuk asai viabiliti sel dalam penyaringan proliferasi dan sitotoksik ke atas sel osteoblas fetus manusia. Pengukuran dibuat secara kolorimetrik. Kit ini mengandungi [3-(4,5-dimethylthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium, inner salt; MTS] dan reagen berpasangan elektron (phenazin methosulfat; PMS). Secara prinsipnya, sel hidup mempunyai enzim dehydrogenase yang menukarkan MTS kepada produk formazan. Kuantiti formazan yang terhasil adalah berkadar langsung dengan jumlah sel yang hidup dan boleh diukur pada panjang gelombang 490 nm menggunakan pembaca plat mikro. Reagen MTS dan PMS dicampur dengan kadar nisbah 1:20 dan dibuat pembahagian kecil dan disimpan pada suhu -20°C. Apabila hendak digunakan untuk pengujian, campuran MTS tersebut ditambahkan ke dalam media kultur lengkap (CCM) pada nisbah 1:5 bagi mendapatkan kepekatan akhir 333 µg/ml MTS dan 25 µM PMS.

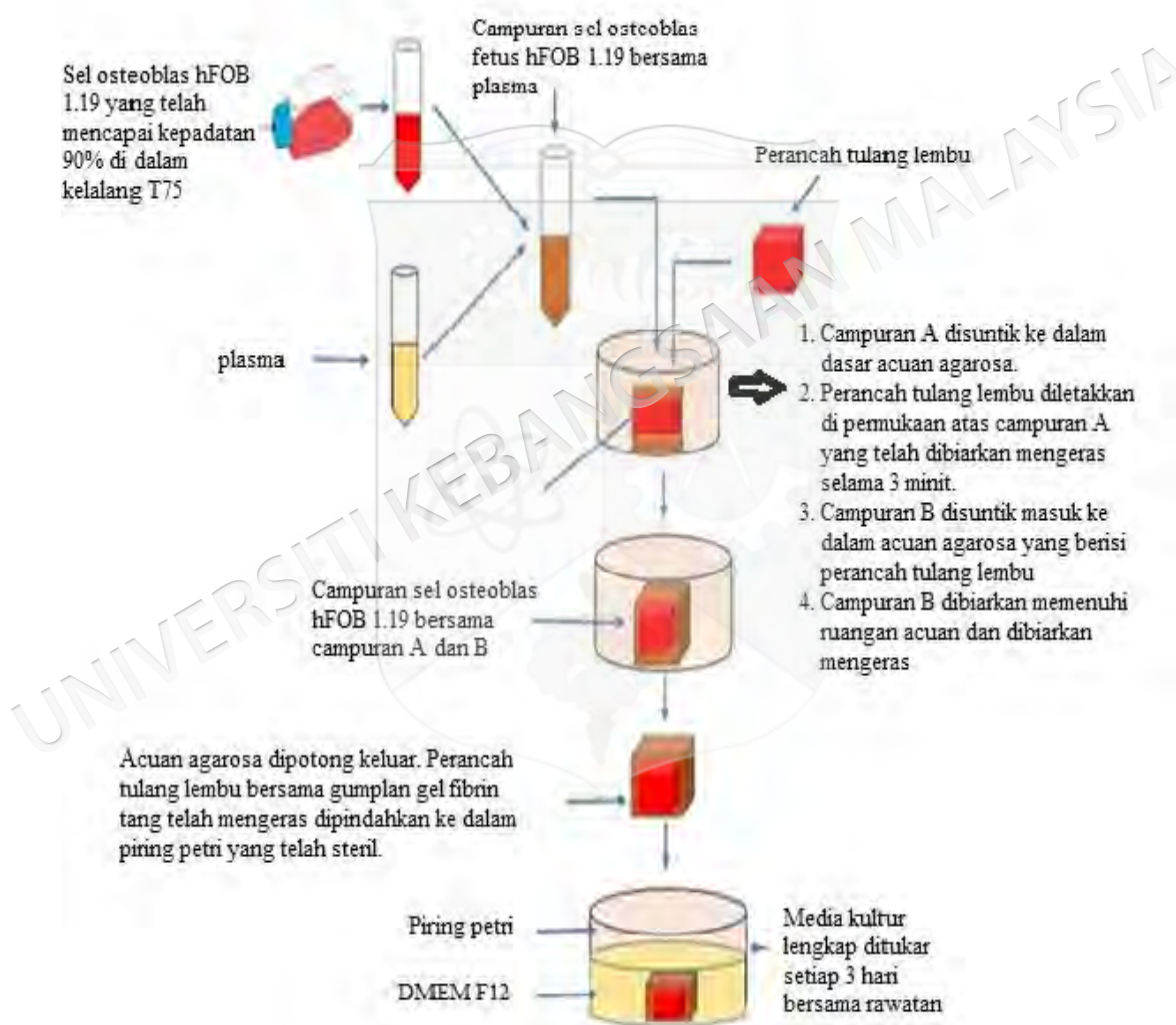
Sel osteoblas fetus manusia dibiakkan pada plat mikro 96 telaga bersteril dengan kepadatan 1.0×10^4 secara tripikat. Setelah 24 jam pertama, sel osteoblas fetus manusia dirawat dengan kawalan dan rawatan isomer vitamin E. Sel tersebut diberi pengeraman selama 24 jam dengan kesemua jenis rawatan. Apabila masa rawatan tamat, kesemua kumpulan digantikan dengan 100 µl media baru. Kemudian, 20 µl larutan MTS dimasukkan ke semua telaga dan dieram selama 4 jam. Langkah ini dilakukan dalam keadaan gelap kerana larutan MTS sensitif terhadap cahaya. Nilai absorbans warna yang terhasil diperolehi pada jarak gelombang 490 nm menggunakan spektrofotometer mikroplat Tecan. Peratus viabiliti sel dinyatakan sebagai perbandingan absorbans rawatan dengan absorbans kawalan, dan didarab dengan 100%.

3.7.9 Pengkulturan Sel Osteoblas Fetus Manusia Pada Perancah Tulang Lembu

Pengkulturan sel osteoblas di dalam perancah tulang lembu adalah untuk melihat sel-sel berinteraksi seperti proses pembentukan semula tulang. Kaedah pengkulturan sel osteoblas fetus manusia, hFOB 1.19 pada perancah tulang lembu dimulakan dengan menyediakan acuan agarosa di dalam plat 6 telaga. Sel osteoblas akan dibiakkan terlebih dahulu di dalam tapak kelalang 75cm^2 sehingga mencapai kepadatan sel sebanyak 90%. Sel osteoblas dengan kepekatan 2×10^6 akan diambil dan dicampurkan bersama dengan 2 mL serum yang telah dicampurkan dengan 0.5 M kalsium klorida. Campuran tersebut dilabelkan sebagai Campuran A. Campuran tersebut dicampurkan sebatu. 0.5ml campuran A diisi ke dalam setiap acuan agarosa di dalam plat 6 telaga. Sebatian dibiarkan seketika untuk mengeras. Sebatian dibiarkan seketika dalam masa 2 minit. Setelah itu, perancah tulang lembu akan dimasukkan di lapisan atas campuran A yang hampir mengeras. Bagi penyediaan campuran B, %. Sel osteoblas dengan kepekatan sel sebanyak 2×10^6 akan diambil dan dicampurkan bersama dengan 7 mL serum yang telah dicampurkan dengan 0.5 M kalsium klorida. Campuran B akan diisi di bahagian atas perancah tulang lembu dan dibiarkan memenuhi kawasan acuan. Campuran akan dibiarkan mengeras keseluruhannya. Campuran A dan B akan membentuk gel fibrin. Gel fibrin ini akan dibiarkan sepenuhnya mengeras dalam tempoh 30 minit. Setelah itu, perancah tulang lembu bersama gel fibrin akan dikeluarkan daripada acuan agarosa dengan cara memotong lebihan agarosa tersebut dengan menggunakan skapel yang telah disteril.

Perancah tulang lembu dipindahkan ke dalam plat 6 telaga steril. Sebanyak 6 mL media lengkap akan di masukkan ke dalam setiap telaga. Perancah tulang lembu perlu berada dalam keadaan terapung sewaktu dipindahkan bagi memastikan setiap bahagian dalam perancah tulang lembu memperoleh nutrien yang mencukupi. Setelah itu plat 6 telaga yang mengandungi perancah tulang lembu dieram di dalam inkubator karbon dioksida di bawah keadaan piawai kultur (37°C , 95% kelembapan dan 5% kepekatan CO_2). Setelah semalaman, keadaan media diperiksa bagi memastikan tiada sebarang kontaminasi. Media dan rawatan ditukar bagi setelah 3 hari rendaman. Rawatan akan dicampurkan di dalam media yang lengkap.

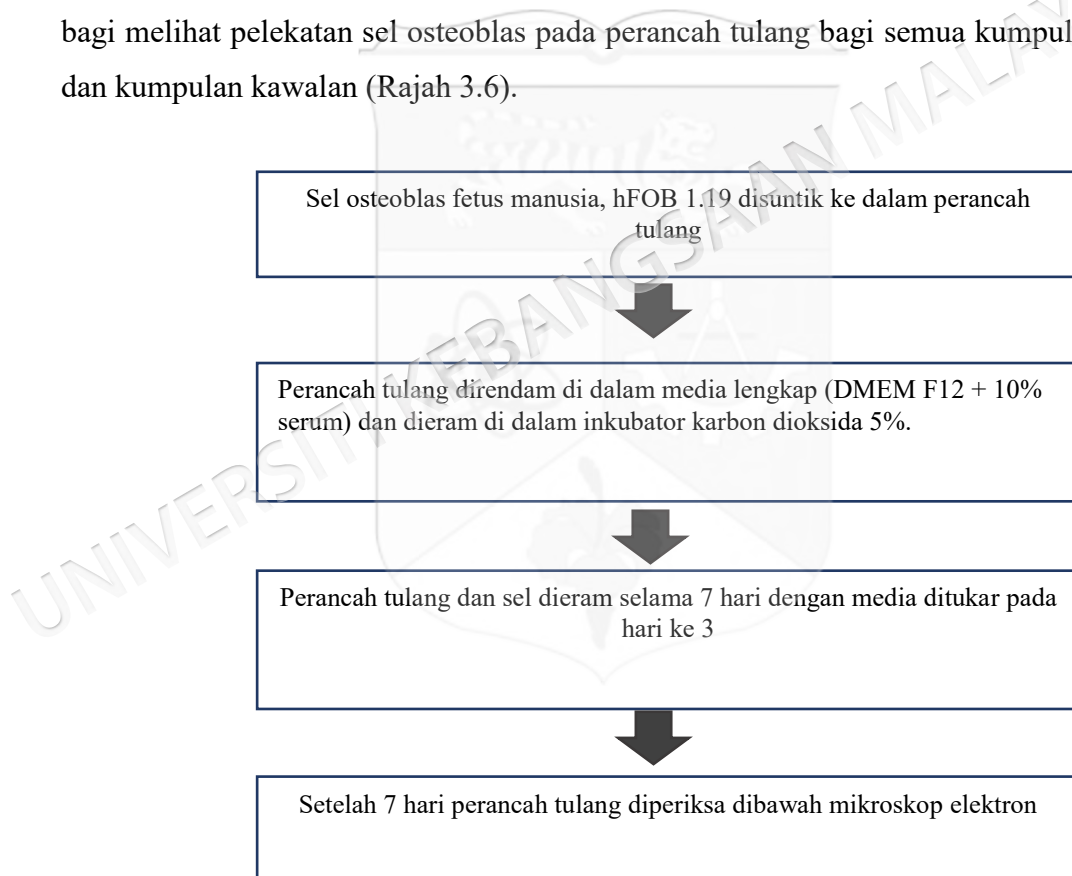
Perancah tulang lembu dieram selama 21 hari dengan media lengkap dan rawatan diperbaharui setiap 3 hari. Perancah tulang lembu pada perlu digoncang lembut setiap hari bagi memastikan perancah tulang lembu mendapat nutrien yang sekata. Perancah tulang lembu juga dipusingkan permukaan bagi tempoh setiap dua hari. Rajah 3.5 adalah gambaran kaedah suntikan sel osteoblas ke dalam tulang perancah. Perancah tulang lembu akan dirawat dan dieram dalam tempoh 21 hari. Media lengkap berserta rawatan akan diganti setiap 3 hari.



Rajah 3.5 Pengkulturan sel osteoblas fetus manusia hFOB 1.19 pada perancah tulang lembu

3.7.10 Pengimbasan Elektron Mikroskop bagi Pelekatan Sel Osteoblas pada Perancah Tulang Lembu

Setelah 7 hari rawatan, perancah tulang lembu bagi semua kumpulan rawatan dan kumpulan kawalan dituai untuk pengimbasan elektron mikroskop. Setelah dituai perancah tulang dicuci dengan penimbal fosfat. Setelah itu kesemua perancah tulang lembu yang dirawat direndam di dalam larutan 25% glutaralaldehid selama 30 min. Kemudian melalui proses dehidrasi dengan merendam perancah tulang ke dalam larutan 35% etanol selama 10 minit, 50% etanol selama 10 minit, 95% etanol selama 100 minit dan 100% etanol selama 10 minit sebanyak 2 kali. Perancah tulang kemudian disaluti dengan saduran serbuk emas dengan menggunakan penyalut emas. Imbasan tulang dibuat bagi melihat pelekatan sel osteoblas pada perancah tulang bagi semua kumpulan rawatan dan kumpulan kawalan (Rajah 3.6).



Rajah 3.6

Proses pengkulturan sel osteoblas pada perancah tulang lembu dan diuji untuk melihat pelekatan sel di dalam perancah

3.7.11 Pengukuran Asai Aktiviti Fosfatase Alkali (ALP)

Sel osteoblas disuntik ke dalam perancah tulang lembu dan diletakkan di dalam media yang mengandungi CCM pada telaga 6 dengan kepekatan 2×10^6 . Selepas 24 jam proliferasi sel pada perancah tulang lembu dirawat dengan rawatan isomer tokotrienol berasingan, α -tokoferol serta kawalan positif di dalam media pembezaan secara triplikat. Rawatan akan dilakukan tiga hari sekali. Aktiviti ALP diukur dengan menggunakan kit komersial asai ALP (Abcam, ab83371). (Jadual 3.14).

Jadual 3.14 Bahan yang terdapat di dalam kit aktiviti Alkaline Fosfatase (ALP)

Bahan	Kuantiti
ALP penimbal asai	100 mL
MUP substrat	1 vial
Enzim ALP	1 vial
Larutan penghenti	25mL

Bagi penyediaan sampel, sampel tulang dibilas dengan menggunakan penimbal fosfat sejuk dan dicampurkan di dalam 100 μ L penimbal asai yang disediakan. Kemudian sampel tulang akan dihancurkan di dalam mesin pemecah manik mikro selama 1 minit. Sampel yang telah dihancurkan diempar di dalam mesin pengempar mikro sejuk pada suhu 4°C pada kelajuan 13 000 g bagi menyingkirkan bahan yang tidak terlarut. Supernatan dikumpul dan dipindahkan ke dalam tiub yang bersih. Sampel perlu sentiasa di simpan di dalam ais bagi menjamin kualiti sampel.

Bagi penyediaan graf piawai, 5 μ L larutan 5mM MUP substrat dicairkan dengan 495 μ L penimbal asai untuk menghasilkan 50 μ M piawai MUP. Siri kepekatan larutan piawai MUP yang disediakan ialah 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 nmol/telaga dengan setiap kepekatan larutan piawai ditambahkan dengan 10 μ L enzim ALP. Enzim ALP akan menukarkan substrat MUP kepada 4-methylumbelliferon (4-MU). Setiap sampel dan larutan piawai akan dieramkan selama 30 minit pada suhu 25°C dalam keadaan gelap. Setelah itu, proses pengeraman dihentikan dengan menambah 20 μ L larutan penghenti (*stop solution*) ke dalam setiap telaga dan digoncang secara sekata. Kemudian mikroplat dibaca dengan menggunakan pembaca plat mikro pada gelombang 360/440 nm. Bacaan

piawai diplotkan pada graf garis lurus dengan kepekatan ALP bagi setiap sampel dikira daripada persamaan $y = mx + c$ yang diperolehi daripada graf. Bacaan sampel kemudian dimasukkan dalam formula tersebut. Aktiviti ALP di kira mengikut perkiraan di bawah:

$$\text{Aktiviti ALP} = \frac{B}{(V/T)} \times D$$

B	=	Jumlah 4-MU dihasilkan per sampel (nmol)
V	=	Isipadu sampel di dalam setiap telaga (ml)
T	=	Reaksi masa (minit)
D	=	Faktor pencairan

3.7.12 Pengukuran Asai Penentuan Osteokalsin (OC)

Sel osteoblas dengan kepekatan 2×10^6 disuntik di dalam perancah tulang lembu dan diletakkan di dalam media yang mengandungi CCM pada telaga 6. Selepas 24 jam proliferasi sel pada perancah tulang lembu, sel akan dirawat dengan rawatan isomer vitamin E secara triplikat. Rawatan akan dilakukan tiga hari sekali. Aras osteokalsin kumpulan rawatan serta kawalan diukur dengan menggunakan kit komersial asai osteokalsin (Elabsience, E-EL-H1343) (Jadual 3.15).

Jadual 3.15 Bahan yang terdapat di dalam kit Asai Osteokalsin

Bahan	Kuantiti
96-telaga microplate	1 plat
Piawai	2 vial
Diluen piawai	1 vial
Pengesan Antibodi Pekat Biotinylated	1 vial
Pencair Pengesan Antibodi Biotinylated	1 vial
Konjugat HRP	1 vial
Penimbal Pencuci	1 vial
Reagen Substrat	1 vial
Penutup plat	5 helai

Untuk penyediaan sampel ujian, perancah tulang lembu dipotong kecil dan dihomogenasi dengan menggunakan mesin penghancur mikro manik bersama-sama dengan penimbal fosfat. Setelah itu sampel diempar di dalam pengempar pada kelajuan 5000g selama 5 minit bagi bagi menyingkirkan bahan tidak terlarut. Supernatan bagi setiap sampel dikumpul dan dimasukkan kedalam tiub yang steril dan bersih.

Sebanyak 100 μ L larutan piawai dan 100 μ L sampel ujian dimasukkan ke dalam telaga serta dieramkan pada suhu 37⁰C selama 90 minit. Setelah itu, semua larutan dikeluarkan dan seterusnya 100 μ L antibodi pengesan biotinylated ditambah ke dalam setiap telaga. Mikroplat digoncang sekata dan dieram kembali selama satu jam pada suhu 37 ⁰C. Setelah itu, setiap telaga dibilas dengan menggunakan penimbal. 100 μ L konjugat HRP ditambah dan dieramkan kembali selama 30 minit. Setelah itu semua larutan dikeluarkan dan dibilas kembali dengan penimbal cucian sebanyak 5 kali. Selepas itu, 90 μ L reagent substrat ditambah ke dalam setiap telaga dan dieram selama 15 minit pada suhu 37⁰C. Kemudian 50 μ L larutan penghenti dimasukkan ke dalam setiap telaga untuk menghentikan semua tindak balas. Akhir sekali, mikroplat dibaca dengan menggunakan pembaca mikroplat pada gelombang 450 nm.

3.7.13 Ujian Histomorfometri Tulang Berstruktur Bagi Sampel Tulang Tak Ternyakhkalsium

i. Perancah tulang tak ternyakhkalsium

Sampel perancah tulang lembu dari semua kumpulan dituai pada hari ke 21 rawatan. Sampel tulang ini mempunyai mineral dan wujud dalam struktur yang keras. Tulang ini memerlukan pembenaman khas bagi pemprosesan. Sehubungan itu, polimer metil metakrilat (PMM) digunakan. Persediaan medium PMM mengikut kaedah difford (1974) dan diubahsuai mengikut protokol kit yang telah digunakan iaitu “*osteo bed bone embedding kit*” dari Polysciences, Inc Jerman.

ii. Pemprosesan Perancah Tulang Tak Ternyalkalsium

Pemprosesan sampel tulang dibuat untuk memberi sokongan kepada tulang, membolehkan hirisan tipis dibuat dan meminimumkan kerosakan pada sampel serta kerosakan pada mata pisau. Pemprosesan melibatkan proses fiksasi, pendehidratan, pembersihan, penyusupan dan pembenaman.

Proses dimulakan dengan proses fiksasi di mana sampel tulang pada hari ke 21 dituai dan di masukkan kedalam larutan 10% penimbal formalin neutral selama 48 jam. Sampel dibiarkan selama 48 jam dan diletakkan di atas mesin pengoyang selama 8 jam setiap hari. Setelah itu, sampel dipindahkan ke dalam botol yang mengandungi larutan etanol 70%, 80%, 95% dan 100% mengikut turutan. Akhir sekali tulang akan direndam di dalam larutan zilena selama 30 minit. Proses rendaman di dalam etanol daripada kepekatan rendah kepada kepekatan tinggi secara berturutan ini dikenali sebagai proses pendehidratan. Proses ini dibuat bagi mengeluarkan cecair daripada sampel tulang setelah fiksasi. Larutan zilena pula berfungsi untuk membuang lebihan lemak pada sampel tulang.

Proses penyusupan dan pembenaman sampel tulang dibuat dengan menggunakan metil metakrilat separa terpolimer (PMMP) mengikut protokol pada "*Osteo-bed bone Embedding Kit*" dari Polysceince, Inc Jerman. Sampel tulang diletakkan kedalam botol kaca yang nipis mengikut orientasi pemotongan tulang, Botol tersebut ditutup dengan penutup plastic dan direndam di dalam tangki rendaman air pada suhu 37°C selama 3 hari agar pembenaman menjadi blok pepejal.

iii. Hirisan Medium Pembenaman Perancah Tulang Tak Ternyalkalsium

Blok PMM yang keras dihiris menggunakan pisau tungsten. Hirisan blok adalah setebal 7 μm dan diwarnakan dengan pewarnaan Von kossa.

iv. Penyediaan Slaid Perancah Tulang Tak Ternyakhkalsium

Hirisan tulang daripada blok PPM diletakkan di dalam piring petri yang mengandungi etanol 50% dan dibiarkan sehingga hirisan yang tergulung terbuka. Selepas itu, hirisan sampel di letakkan ke atas slaid polisin dan larutan penyebar di titk ke atas sampel slaid tersebut. Larutan penyebar perlu dipanaskan pada suhu 60°C sebelum dititis dan digunakan di atas slaid. Larutan penyebar ini digunakan bagi melembutkan hirisan sampel supaya hirisan PPM senang dibentangkan ke atas slaid.

Kemudian hirisan ini perlu ditutup dengan plastik politin dan ditekan supaya hirisan sampel tidak berkedut. Kertas turas pula digunakan bersama bagi menyerap lebihan larutan penyebar. Selepas itu, slaid kaca diletakkan ke atas kertas turas dengan menggunakaa dua klip “bulldog” di mana dikepit di bahagian atas serta bahagian bawah. Slaid tersebut dikeringkan ke dalam ketuhar pada suhu 37°C selama 3 hari untuk memastikan hirisan melekat pada slaid polisin itu. Setelah dipastikan slaid kering serta hirisan betul-betul melekat, barulah slaid tersebut dikeluarkan daripada ketuhar dan boleh melalui proses pewarnaan.

v. Pewarnaan Von Kossa Bagi Perancah Tulang Tak Ternyakhkalsium

Sampel tulang tak ternyakhkalsium diwarnakan dengan pewarnaan von kossa untuk melihat tulang bermineral. Tulang yang bermineral akan diwarnakan dengan warna kehitaman setelah pewarnaan. Pewarnaan von Kossa perlu dilakukan berdasarkan kaedah modifikasi von Kossa (1901). Slaid akan direndam di dalam larutan aseton selama 15 sehingga 20 minit. Tujuan rendaman adalah untuk melarutkan medium PPM yang melekat pada salid tersebut. Kemudian slaid melalui proses rehidrasi di mana slaid tersebut akan direndam ke dalam larutan etanol 100%, 96% (I), 96% (II) dan 70% selama 3 minit untuk setiap rendaman.

Slaid kemudian dibilas dengan air dan dititiskan dengan larutan 1% silver nitrat dan diletakkan di bawah sinaran lampu ultraviolet selama 30 minit untuk membolehkan tindak balas berlaku antara larutan sinar ultraviolet dengan silver nitrat. Setelah slaid penunjukkan perubahan warna kepada coklat kehitaman, slaid tersebut dibilas dengan air

suling. Slaid itu kemudian dititiskan dengan larutan 2.5% sodium tiosulfat selama 5 minit. Larutan sodium tiosulfat berfungsi sebagai agen fiksasi dimana ion silver nitrat daripada silver nitrat akan melekat kuat pada ion kalsium pada matriks tulang. Kemudian slaid akan dibilas kembali dengan air suling dan melalui proses dehidrasi bagi membuang air pada sampel slaid. Proses dehidrasi melibatkan rendaman slaid di dalam kepekatan peratusan etanol meningkat, di mana dimulakan dengan 70%, 96% (I), 96%(II), dan 100% secara berturutan selama 3 minit. Slaid kemudian dibersihkan dengan larutan eter sebanyak 2 kali dalam tempoh masa 5 minit untuk setiap rendaman. Kemudian di titskan dengan larutan DPX sebelum ditutup dengan sisip kaca.

vi. Pengukuran Parameter Histomorfometri Perancah Tulang Tak Ternyakhkalsium

Pengukuran parameter histomorfometri tulang dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan menggunakan perisian penganalisa Imej-PRO Plus versi 5.0.2.9 dan dibantu dengan kamera dari Q-Imaging Micropublisher 5.0, Kanada.

3.7.14 Pengukuran Histomorfometri Tulang Statik Bagi Sampel Tulang Nyahkalsium

i. Sampel Perancah Tulang Nyahkalsium

Sampel perancah tulang lembu dari semua kumpulan dituai pada hari ke 21 rawatan. Sampel difiksasi dan melalui proses pembenaman lilin parafin.

ii. Pemprosesesan Perancah Tulang Nyahkalsium

Perancah tulang lembu dikeluarkan daripada plat kultur dan dibersihkan dahulu dengan menggunakan larutan penimbal fosfat. Kemudian tulang direndam di dalam larutan formalin penimbal neutral 10% bagi menjalani proses nyahkalsium. Rendaman dibuat untuk tempoh dua hari.

Setelah itu, sampel perancah dikeluarkan dan melalui proses dehidrasi dengan merendam sampel ke dalam larutan etanol. Perancah direndam di dalam larutan etanol 50% dan 70% selama satu jam setengah. Kemudian diikuti dengan rendaman di dalam

etanol 80%, 95% serta 100% selama satu jam setengah. Rendaman di dalam etanol 100% dilakukan sebanyak tiga kali.

Selesai proses dehidrasi, perancah tulang lembu akan menjalani proses pembersihan di mana sampel perancah tulang lembu direndam di dalam larutan etanol 100% dan toluen dengan nisbah 1:1 selama 30 minit. Kemudian perancah tulang lembu melalui proses pembedahan dengan merendam sampel di dalam larutan parafin yang telah dicairkan pada suhu 60°C sebanyak tiga kali selama tiga jam bagi setiap tukaran. Seterusnya sampel ditenamkan di dalam paraffin cair untuk membentuk blok paraffin setelah ia membeku menggunakan mesin *paraffin embedder*. Sampel perancah di letakkan di dalam acuan dengan bahagian tulang dipotong secara longitudinal menghadap dasar acuan tersebut. Larutan parafin cair dituangkan ke dalam acuan besi sehingga memenuhi acuan besi dan sampel tulang perancah terbenam. Acuan disejukkan segera di atas piring penyejuk supaya kekal pada orientasinya.

iii. Hirisian Pembedahan Blok Parafin

Blok pembedahan yang tersedia dikeluarkan daripada acuan besi dan dihiris menggunakan mikrotom dengan ketebalan hirisan 5µm. Helaian potongan sampel diapungkan di dalam mandian apungan tisu pada suhu 45°C sebelum dilekatkan pada slaid kaca. Slaid dikeringkan pada alat pengering slaid pada suhu 45°C. Slaid yang terhasil digunakan untuk pewarnaan hematoksilin dan eosin.

iv. Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Pewarnaan dimulakan dengan merendam slaid di dalam larutan xilena sebanyak 2 kali selama 5 minit. Tujuan rendaman adalah bagi menyingkirkan parafin pada sampel. Kemudian slaid direndam ke dalam larutan etanol secara menurun. Proses ini dinamakan proses rehidrasi. Rendaman akan dimulakan dengan larutan etanol 100%, 95%, 80%, 70% dan 50% selama 3 minit bagi setiap rendaman.

Kemudian slaid diwarnakan dengan dengan pewarnaan hematoksilin dengan menitiskan pewarna hematoksilin di keseluruhan slaid. Pewarnaan dibiarkan selama 10 minit. Kemudian air paip dialirkan pada slaid. Setitis asid alkohol dititiskan pada slaid dan dibiarkan selama 2 saat. Setelah itu, larutan eosin dititiskan di atas slaid selama 6 minit. Slaid kemudian direndam di dalam larutan etanol 95% dan 100% sebanyak 2 kali rendaman selama 3 minit. Yang terakhir, slaid direndam di dalam larutan xilena sebanyak dua kali selama 5 minit bagi setiap rendaman. Kemudian, medium pelekapan dititiskan ke atas slaid dan dilekatkan bersama sisip kaca. Slaid dibiarkan kering, sebelum pemerhatian dibuat di bawah mikroskop cahaya.

v. Pengukuran Parameter Histomorfometri Tulang Perancah Nyahkalsium

Pengukuran parameter histomorfometri tulang dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan menggunakan perisian penganalisa Imej-PRO Plus versi 5.0.2.9 dan dibantu dengan kamera dari Q-Imaging Micropublisher 5.0, Kanada.

3.7.15 Pengukuran Bagi Imbasan Tomografi Berkomputer (CT scan)

Pengukuran imbasan tomografi berkomputer dilakukan di Pusat Kejuteraan Tisu, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia. Imbasan dibuat dengan menggunakan mesin pengimejan Micro CT Sky Scan 1076 keluaran SkyScan, Kontich, Belgium. Sistem ini dilengkapi dengan komputer dan perisian khas untuk penganalisaan imej. Dalam kajian ini, analisa tomografi dijalankan menggunakan perancah tulang lembu setelah rawatan selama 21 hari. Tulang yang telah selesai rawatan dikeluarkan daripada media dan direndam di dalam larutan formalin 10%.

Untuk tujuan penganalisaan, perancah tulang lembu dikeluarkan daripada larutan formalin 10% dan dipindahkan ke dalam bekas pemegang. Perancah tulang lembu di susun sebanyak sebaris sebanyak 8 sampel. Pengimbasan di buat secara berkumpulan di mana masa pengimbasan mengambil masa 2 jam bagi setiap sampel. Kawasan pada setiap kepingan perancah tulang lembu dikontur untuk tujuan analisa maklumat. Pengkonturan dibuat secara separa automatik menggunakan perisian CTAn (V1.16.1.0 +, SkyScan, Belgium) Parameter yang terlibat dalam penentuan protokol ini adalah

ketebalan trabekular, peratusan pecahan isipadu tulang (BV/TV), bilangan trabekular (Tb. N) jarak antara trabekular (Tb. Sp) serta peratus keporosan tulang. Imbasan tulang yang terhasil akan menghasilkan set imej 2D dalam bentuk menegak. Sampel daripada imej 2D akan dikonturkan pada 200 kepingan imej bagi menghasilkan imej 3D.

3.8 Analisis Statistik

Semua kajian dijalankan secara 6 replikat. Perisian SPSS (Statistical Package for Social Science) v.21 digunakan untuk menganalisis data. Hasil dibentangkan sebagai min $\pm$ sisihan piawai (SEM). Data yang diperolehi diuji kenormalannya dengan ujian *Shapiro-Wilk*. Data yang bertaburan normal dan pembezaan signifikan antara kumpulan ditentukan melalui analisis statistik ujian parametric *Tukey One Way Anova* diikuti dengan *post hoc Tukey's hsd*. Parameter yang melibatkan sela masa tertentu di analisis menggunakan *repeated-measure ANOVA*. Data bertaburan tidak normal dianalisis menggunakan ujian bukan parametric Kruskal Wallis diikuti dengan Mann-Whitney U. Tahap signifikan adalah pada aras nilai keertian $p < 0.05$.

BAB 1V

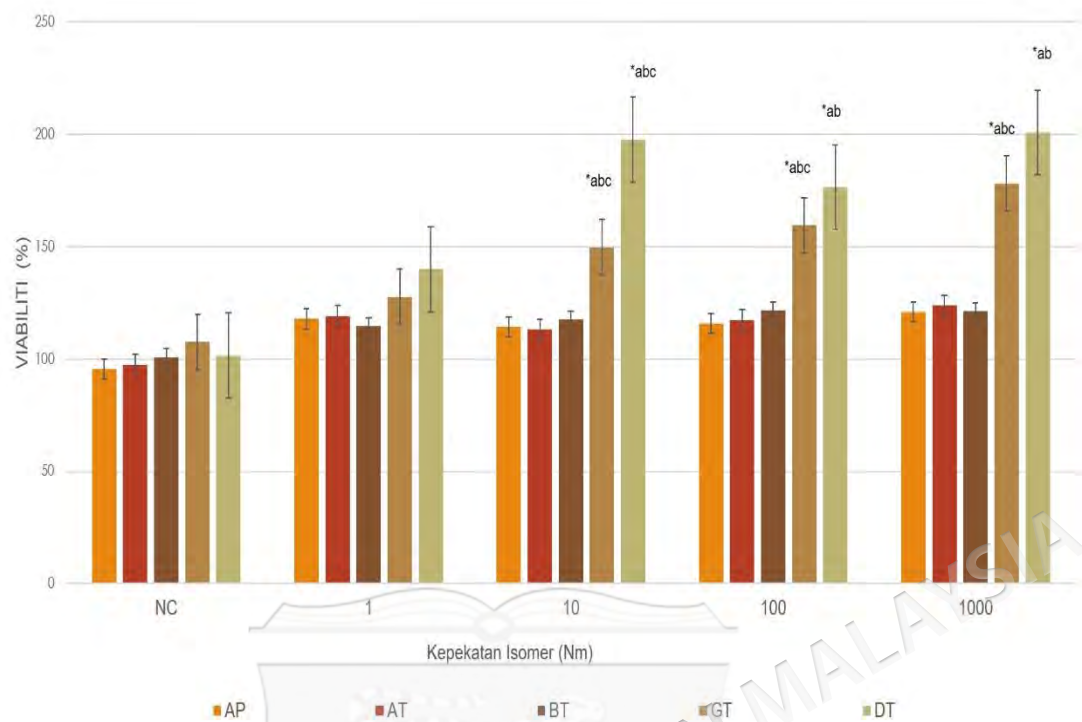
HASIL

4.1 PARAMETER UJIAN VIABILITI SEL BAGI PEMILIHAN KEPEKATAN RAWATAN ISOMER VITAMIN E

Asai viabiliti MTS dijalankan untuk menentukan kepekatan yang sesuai untuk digunakan dalam parameter seterusnya. Titisan sel osteoblas hFOB 1.19 fetus manusia dirawat dengan kepekatan isomer tokotrienol (α -, β -, γ - dan δ -tokotrienol) bermula pada 1, 10, 100 1000 nM. Rajah 4.1 menunjukkan graf viabiliti sel osteoblas terhadap kepekatan isomer vitamin E. Analisis menunjukkan bahawa kesemua isomer tidak menunjukkan kesan sitotoksik ke atas sel hFOB 1.19 walaupun pada kepekatan tinggi 1000 nM. γ - serta δ -tokotrienol pada 10-1000 nM meningkatkan viabiliti sel secara signifikan berbanding isomer vitamin E yang lain. Dalam kajian in kepekatan isomer vitamin E pertengahan telah dipilih untuk digunakan untuk ujikaji yang seterusnya. Kepekatan yang dipilih dalam ujikaji seterusnya adalah 100 nM bagi semua jenis isomer vitamin E. Pembahagian kumpulan rawatan ditunjukkan seperti dalam Jadual 4.1.

Jadual 4. 1 Jadual pembahagian kumpulan bagi ujian viabiliti sel

Kumpulan	Rawatan
NC	Kawalan negatif
AP	Sel osteoblas fetus manusia yang dirawat dengan α -tokoferol
AT	Sel osteoblas fetus yang dirawat dengan α -tokotrienol
BT	Sel osteoblas fetus yang dirawat dengan β -tokotrienol
GT	Sel osteoblas fetus yang dirawat dengan γ -tokotrienol
DT	Sel osteoblas fetus yang dirawat dengan δ -tokotrienol

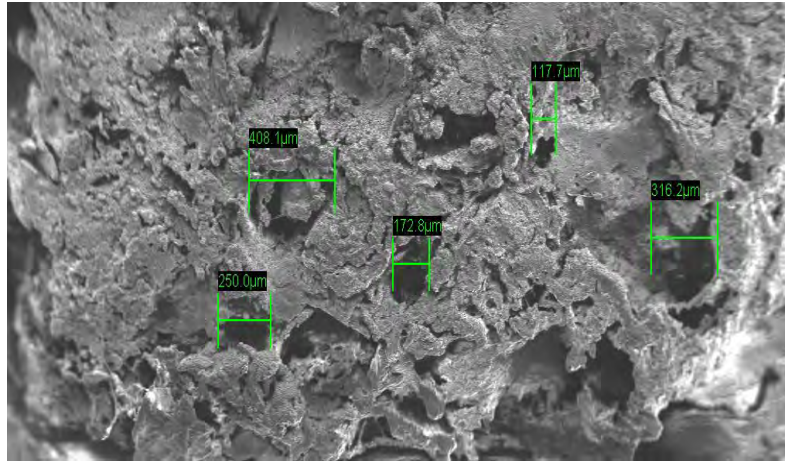


Rajah 4.1 Viabiliti sel selepas rawatan isomer vitamin E yang berbeza kepekatan tokotrienol dan α -tokoferol (1, 10, 100 dan 1000 nM) dibandingkan dengan kumpulan kawalan. Nilai dinyatakan dalam bentuk min $\pm$ (SEM), (n=6)

- # menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan
- * menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol
- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol
- b menunjukkan perbezaan ketara dengan β -tokotrienol
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol

4.2 IMBASAN MIKROSKOP ELEKTRON

Pengimbasan keratan rentas perancah dibuat dengan menggunakan imbasan mikroskop electron (SEM) bagi melihat pelekatan sel osteoblas pada perancah lembu. Mikrofotograf 4.1 menunjukkan perancah tulang lembu yang dinyahkalsium tanpa sebarang rawatan (OB) kelihatan berpori dengan saiz yang berbeza. Saiz keporosan bagi setiap perancah adalah berbeza, namun purata saiz keporosan adalah 352 μm . Tulang kawalan positif (PC) kelihatan licin dengan permukaan yang sekata dan tidak kelihatan sebarang pori. Manakala tulang kawalan negatif (NC) mempunyai permukaan yang tidak sekata dengan pori yang jelas pada permukaan perancah. Semua perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E dilitupi dengan sel osteoblas. Sel dilihat melekat dengan baik pada dinding yang berpori. Perancah tulang lembu yang dirawat dengan γ - dan δ -tokotrienol kelihatan mempunyai lebih timbunan sel pada permukaan perancah berbanding kumpulan rawatan isomer vitamin E yang lain (Mikrofotograf 4.2). Permukaan perancah tulang yang dirawat dengan δ -tokotrienol (DT) dan γ -tokotrienol (GT) kelihatan lebih berkedut, berlipat dan tidak sekata. Pembahagian kumpulan rawatan ditunjukkan seperti dalam Jadual 4.2.



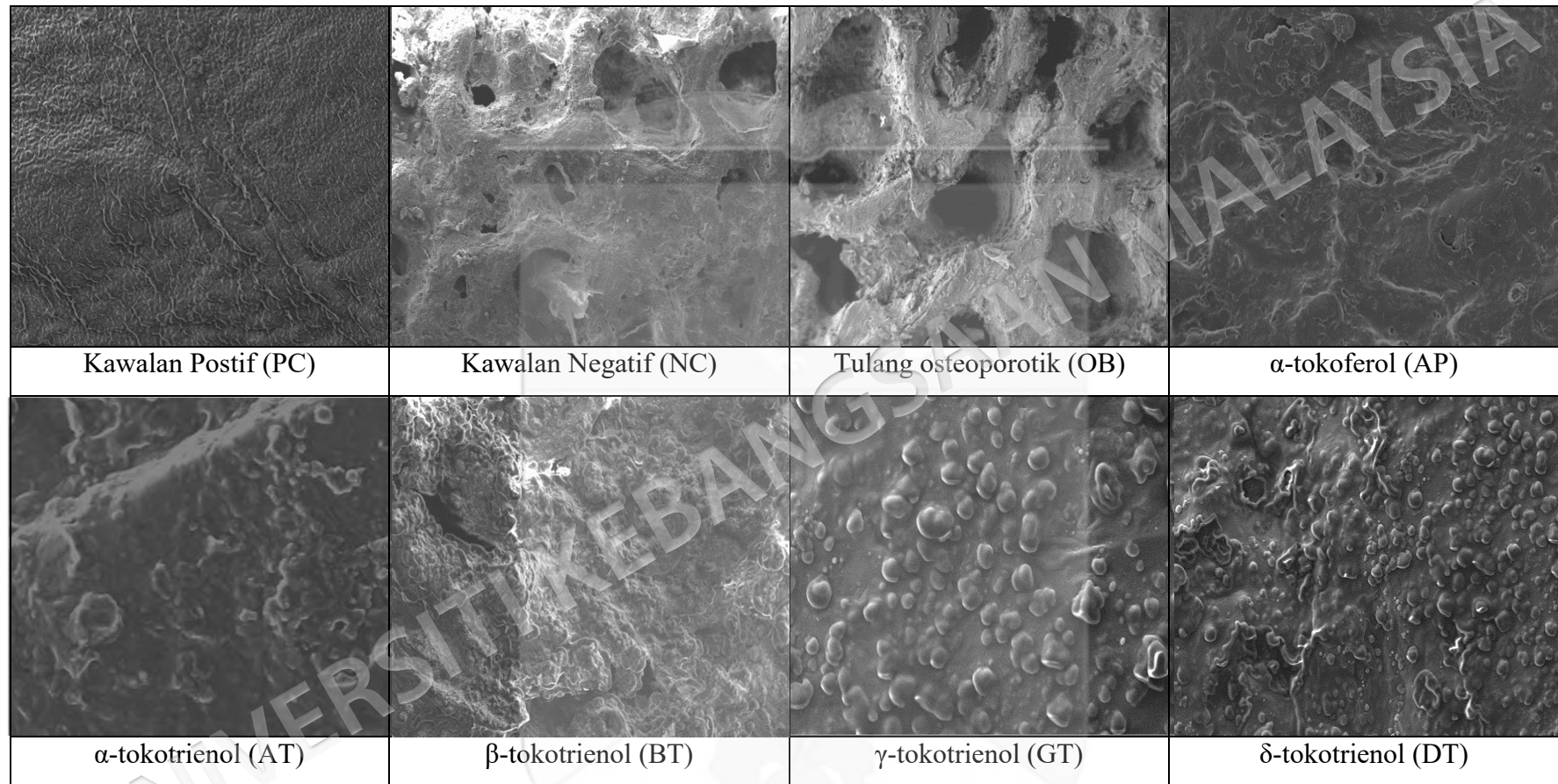
Mikrofotograf 4.1

Mikrofotograf permukaan tulang perancah osteoporotik (OB) menunjukkan saiz keporosan yang berbeza di bawah pembesaran x5000

Jadual 4. 2

Jadual pembahagian kumpulan rawatan perancah tulang lembu

Kumpulan	Rawatan
PC	Kawalan positif (Perancah tulang asli (<i>native</i>))
NC	Kawalan negatif (Perancah tulang lembu nyahkalsium yang disuntik dengan sel osteoblas)
OB	Tulang osteoporotik (Perancah tulang lembu yang nyahkalsium tanpa media)
AP	Perancah NC yang dirawat dengan 100 nM α -tokoferol
AT	Perancah NC yang dirawat dengan 100 nM α -tokotrienol
BT	Perancah NC yang dirawat dengan 100 nM β -tokotrienol
GT	Perancah NC yang dirawat dengan 100 nM γ -tokotrienol
DT	Perancah NC yang dirawat dengan 100 nM δ -tokotrienol



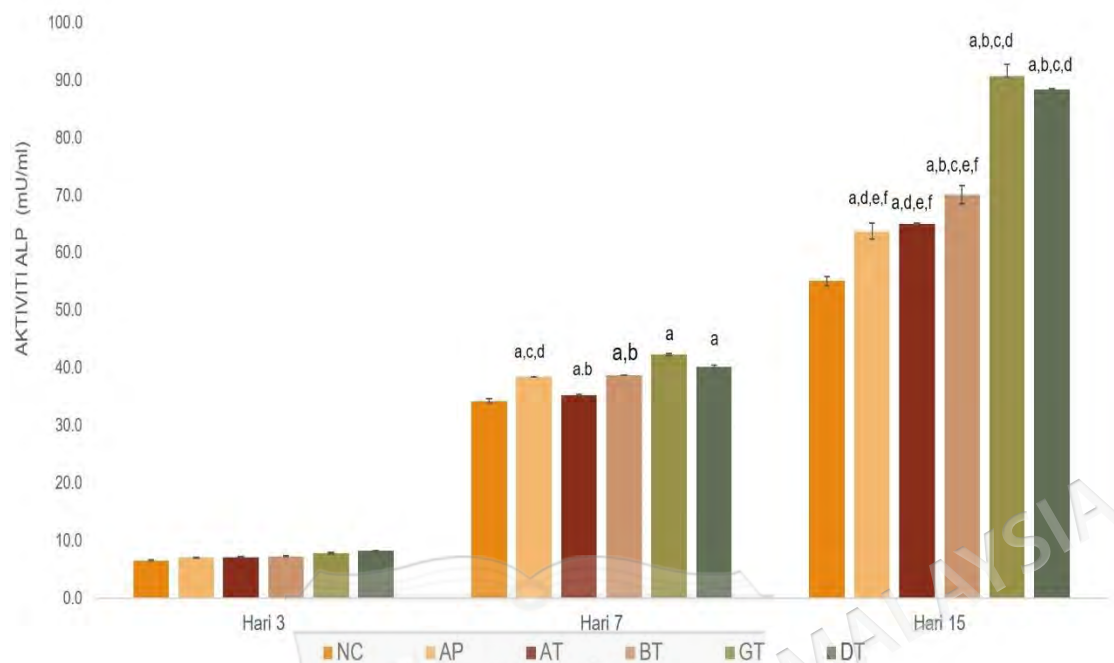
Mikrofotograf 4.2

Mikrofotograf daripada mikroskop elektron pada permukaan perancah yang telah dirawat dengan isomer vitamin E isomer pada hari ke 7 rawatan. Pembesaran x5000

4.3 PARAMETER ASAI BIOKIMIA

4.3.1 Asai Aktiviti Fosfatase Alkali

Penentuan aktiviti Fosfatase Alkali (ALP) dilakukan untuk menentukan kesan rawatan isomer vitamin E terhadap pembezaan sel osteoblas. Aktiviti enzim ALP diukur selepas sel dirawat dengan isomer vitamin E pada hari ke 3, 7 dan 15 (Rajah 4.2). Analisis ANOVA dengan perbandingan secara berpasangan mendapati terdapat kesan 'masa' ($P < 0.05$) dan 'masa x rawatan' ($P < 0.05$) yang signifikan terhadap aktiviti enzim ALP. Berdasarkan graf tersebut aktiviti ALP meningkat pada hari ke 7 dan ke 15 dalam semua kumpulan rawatan isomer vitamin E berbanding hari ke 3. Tiada peningkatan signifikan bagi semua kumpulan rawatan isomer vitamin E berbanding kawalan pada hari ke 3. Pada hari ke 7, semua kumpulan rawatan isomer vitamin E menunjukkan peningkatan signifikan berbanding kawalan. Pada hari ke 15, semua kumpulan rawatan isomer vitamin E menunjukkan peningkatan aktiviti ALP berbanding kawalan. Pada hari ke 15, γ - dan δ -tokotrienol menunjukkan peningkatan signifikan berbanding isomer vitamin E yang lain. Hasil kajian ini, menunjukkan rawatan isomer vitamin E meningkatkan penghasilan aktiviti ALP berbanding kawalan. Aktiviti ALP meningkat secara signifikan pada semua kumpulan rawatan isomer vitamin E pada sela masa ke 7 dan 15 berbanding hari ke 3.

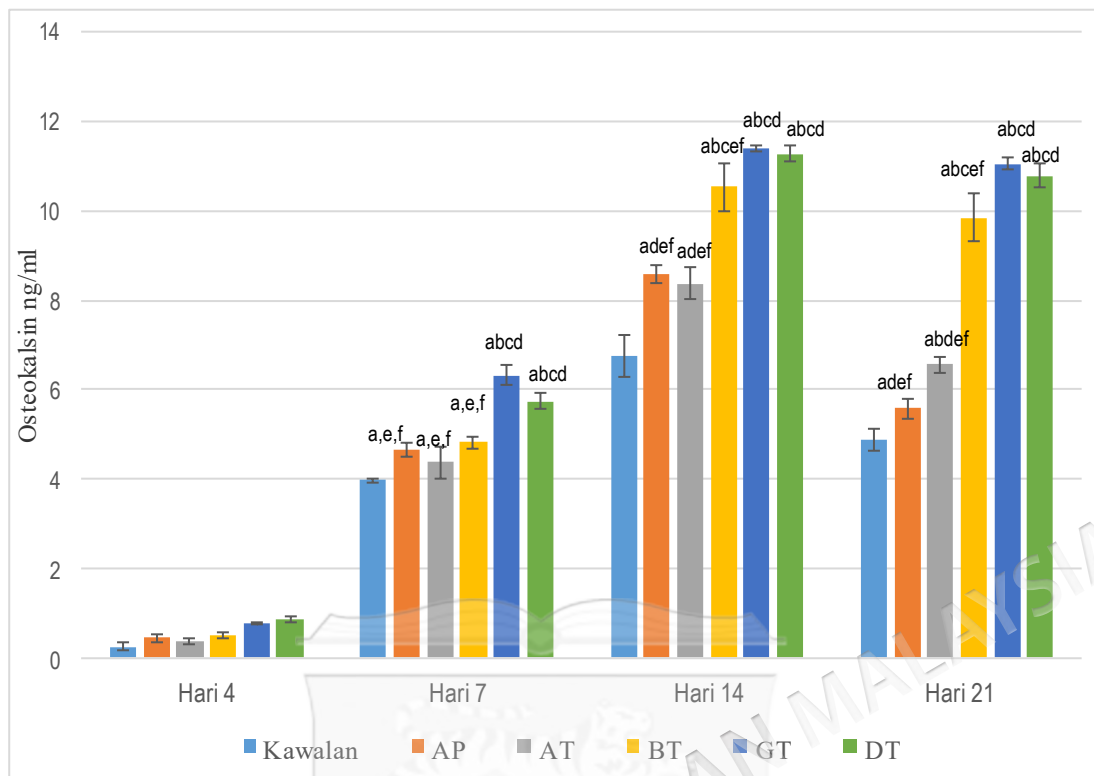


Rajah 4.2 Aktiviti ALP selepas rawatan dengan isomer vitamin E pada hari ke 3, 7 dan 15 hari. Nilai dinyatakan dalam bentuk $\text{min} \pm (\text{SEM})$, (n=6)

- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan (NC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- d menunjukkan perbezaan ketara dengan β -tokotrienol (BT)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan δ -tokotrienol (DT)

4.3.2 Osteokalsin

Ekspresi protein osteokalsin diasai mengikut kaedah ELISA. Ekspresi osteokalsin diukur pada hari ke-4, 7, 14 dan 21. Ekspresi osteokalsin meningkat mengikut sela masa dari hari ke 4 sehingga ke hari 14 dan menurun sedikit pada hari ke-21. Analisis ANOVA dengan perbandingan secara berpasangan mendapati terdapat kesan 'masa' ($P < 0.05$) dan 'masa x rawatan' ($P < 0.05$) yang signifikan terhadap osteokalsin. Pada hari ke 7, 14 dan hari ke 21 aras osteokalsin bagi kumpulan rawatan isomer vitamin E meningkat secara signifikan berbanding kawalan. Manakala γ - dan δ -tokotrienol meningkat secara signifikan berbanding isomer vitamin E yang lain pada hari ke-7, -14 dan -21. Hasil kajian ini, menunjukkan rawatan isomer vitamin E meningkatkan penghasilan osteokalsin berbanding kawalan. Aras osteokalsin meningkat secara signifikan pada semua kumpulan rawatan isomer vitamin E pada sela masa ke 7, 14 dan 21 berbanding hari ke 3 (Rajah 4.3).



Rajah 4.3 Graf perbandingan osteokalsin bagi perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E. Nilai dinyatakan dalam bentuk $\text{min} \pm (\text{SEM})$, (n=6)

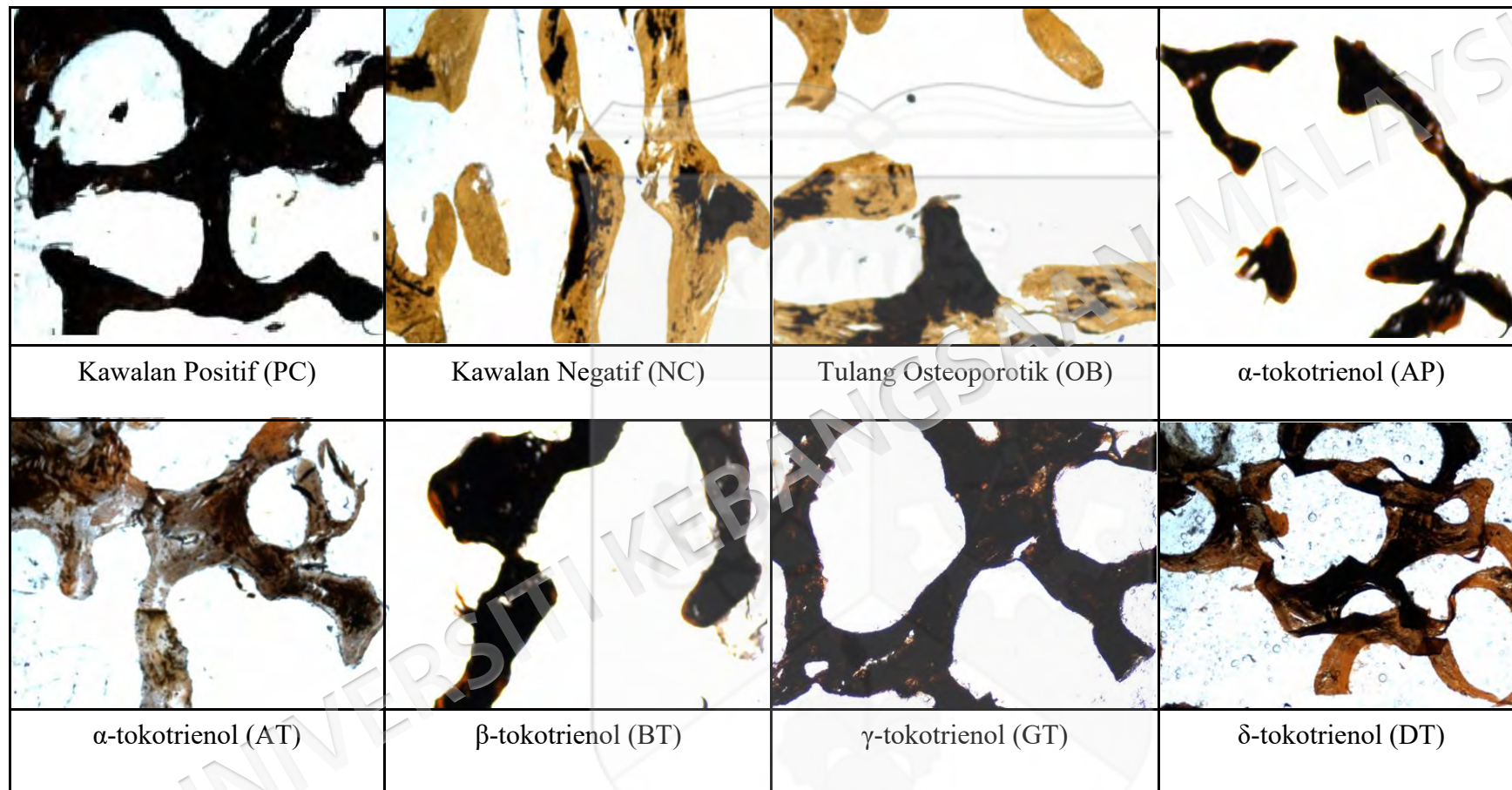
- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan (NC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- d menunjukkan perbezaan ketara dengan β -tokotrienol (BT)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan δ -tokotrienol (DT)

4.4 HISTOMORFOMETRI TULANG

A. Histomorfometri Berstruktur Tulang

4.4.1 Pewarnaan von Kossa Histomorfometri Berstruktur

Mikrofotograf 4.3 menunjukkan pewarnaan von Kossa pada keratan rentas perancah tulang lembu yang telah dirawat dengan isomer vitamin E. Warna trabekular yang lebih gelap menunjukkan pemendapan kalsium yang lebih tinggi. Kumpulan kawalan positif menunjukkan pemendapan kalsium yang lebih tinggi dengan ukuran trabekular yang lebih tebal. Trabekular pada kumpulan OB kelihatan lebih cerah warnanya menunjukkan pemendapan kalsium yang kurang berbanding kumpulan lain. Ukuran trabekular juga dilihat kurang tebal pada kawalan negatif (NC) serta α -tokoferol (AP) dibandingkan dengan α -tokotrienol (AT) dan β -tokotrienol (BT). Kumpulan γ -tokotrienol (GT) menunjukkan ukuran trabekular yang paling tebal dibandingkan antara semua rawatan vitamin E dan diikuti dengan rawatan δ -tokotrienol (DT).



Mikrofotograf 4.3

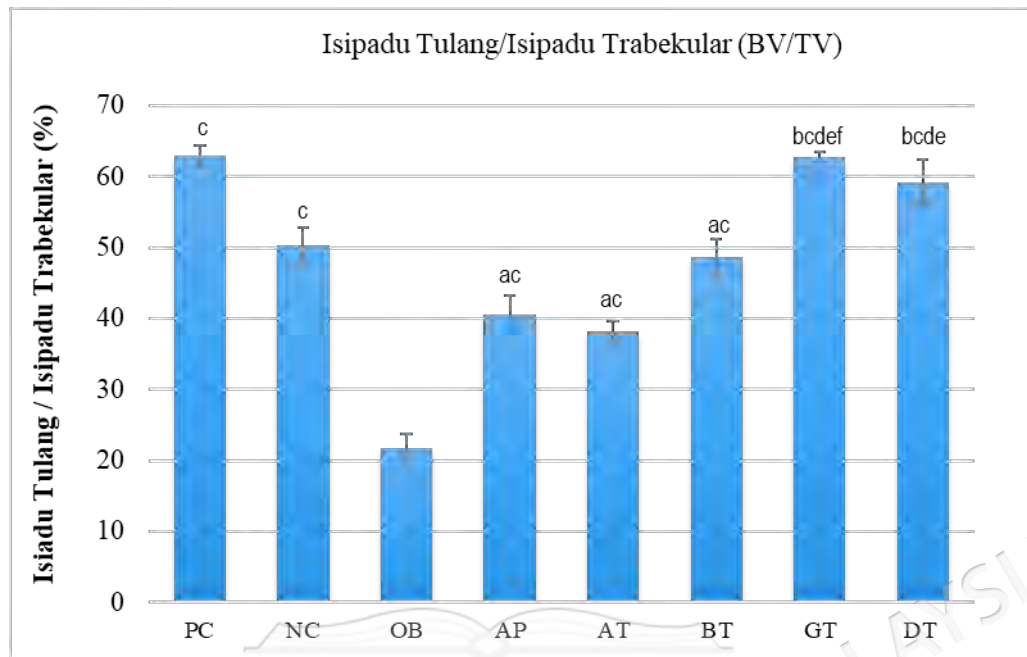
Mikrofotograf menunjukkan keratan rentas perancah tulang lembu yang telah diberi rawatan isomer vitamin E dan diwarnakan dengan perwarnaan von Kossa dengan pembesaran x20

4.4.2 Isipadu Tulang Trabekular (BV/TV)

Hasil kajian menunjukkan kumpulan PC menunjukkan peningkatan isipadu trabekular yang signifikan berbanding tulang OB. Kumpulan OB menunjukkan penurunan ketara dibandingkan kumpulan PC dan NC. Hasil kajian menunjukkan peratusan isipadu tulang trabekular kesemua rawatan isomer vitamin E meningkat secara signifikan ($P < 0.05$) berbanding kumpulan OB. Tiada peningkatan signifikan antara kumpulan rawatan γ -tokotrienol (GT) dan δ -tokotrienol (DT). Hasil kajian ditunjukkan pada Rajah 4.4 dan Mikrofotograf 4.3.

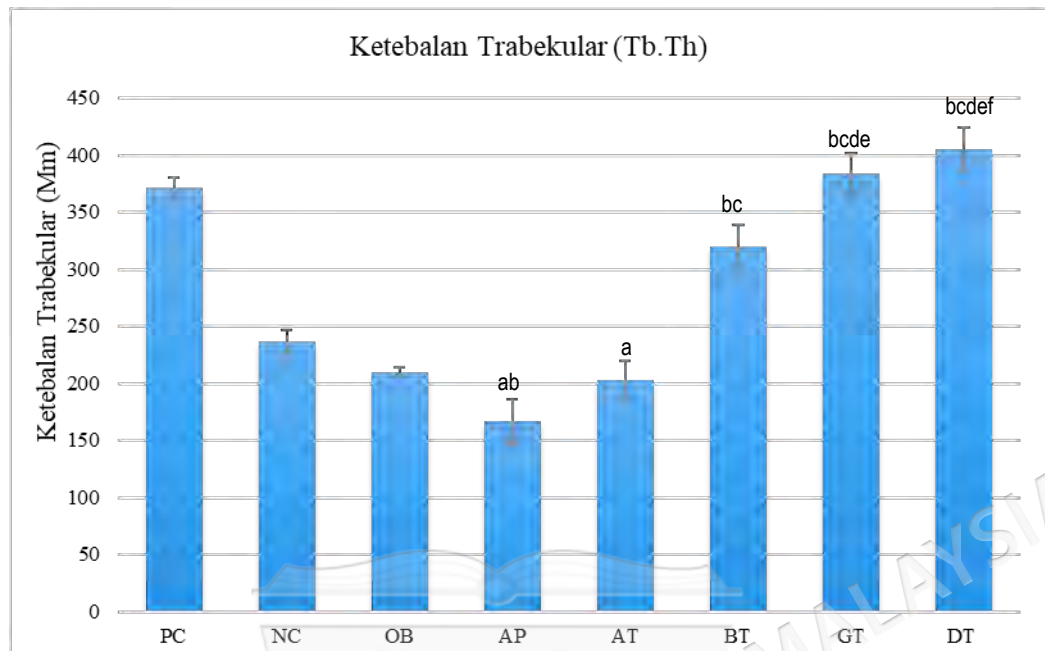
4.4.3 Ketebalan Trabekular (Tb. Th)

Kesan rawatan isomer vitamin E ke atas ketebalan trabekular (Tb, Th) perancah tulang lembu ditunjukkan pada Rajah 4.5 dan Mikrofotograf 4.3. Tiada peningkatan signifikan ketebalan trabekular tulang PC dibandingkan dengan NC dan OB. Hasil keputusan menunjukkan kumpulan rawatan AT dan BT meningkatkan ketebalan yang ketara berbanding PC. Manakala kumpulan rawatan AP, BT, GT dan DT meningkat secara signifikan berbanding NC. Hasil kajian menunjukkan purata ketebalan trabekular kumpulan BT, GT serta DT meningkat secara signifikan ($P < 0.05$) berbanding kumpulan OB. Tiada peningkatan signifikan bagi kumpulan GT dibandingkan dengan kumpulan DT.



Rajah 4.4 Peratus isipadu tulang trabekular (BV/TV) bagi semua kumpulan rawatan. Nilai dinyatakan dalam bentuk $\text{min} \pm (\text{SEM})$, (n=6).

- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan positif (PC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan negatif (NC)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan tulang osteoporotik (OB)
- d menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan β -tokotrienol (BT)
- g menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)



Rajah 4.5 Graf perbandingan ketebalan trabekular antara semua kumplan rawatan isomer vitamin E. Nilai dinyatakan dalam bentuk $\text{min} \pm (\text{SEM})$, (n=6)

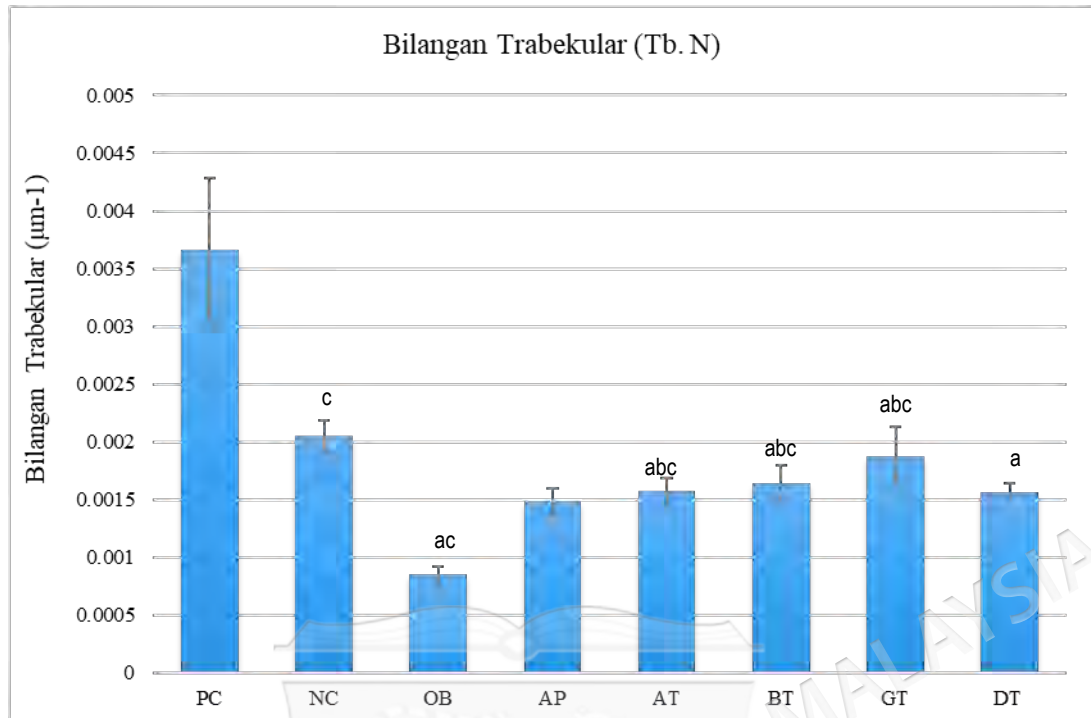
- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan positif (PC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan negatif (NC)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan tulang osteoporotik (OB)
- d menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan β -tokotrienol (BT)
- g menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)

4.4.4 Bilangan Trabekular (Tb. N)

Semua kumpulan rawatan tokotrienol dan tokoferol menunjukkan peningkatan bilangan trabekular secara signifikan berbanding tulang tanpa rawatan (PC). Hasil kajian menunjukkan semua rawatan tokoferol serta tokotrienol kecuali δ -tokotrienol meningkat secara signifikan berbanding kumpulan OB. Selain itu, kumpulan AT dan DT tidak menunjukkan sebarang perbezaan signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (NC). Tiada peningkatan bilangan trabekular bagi kumpulan GT dibandingkan kumpulan DT. Hasil kajian ditunjukkan pada Rajah 4.6 serta Mikrofotograf 4.3.

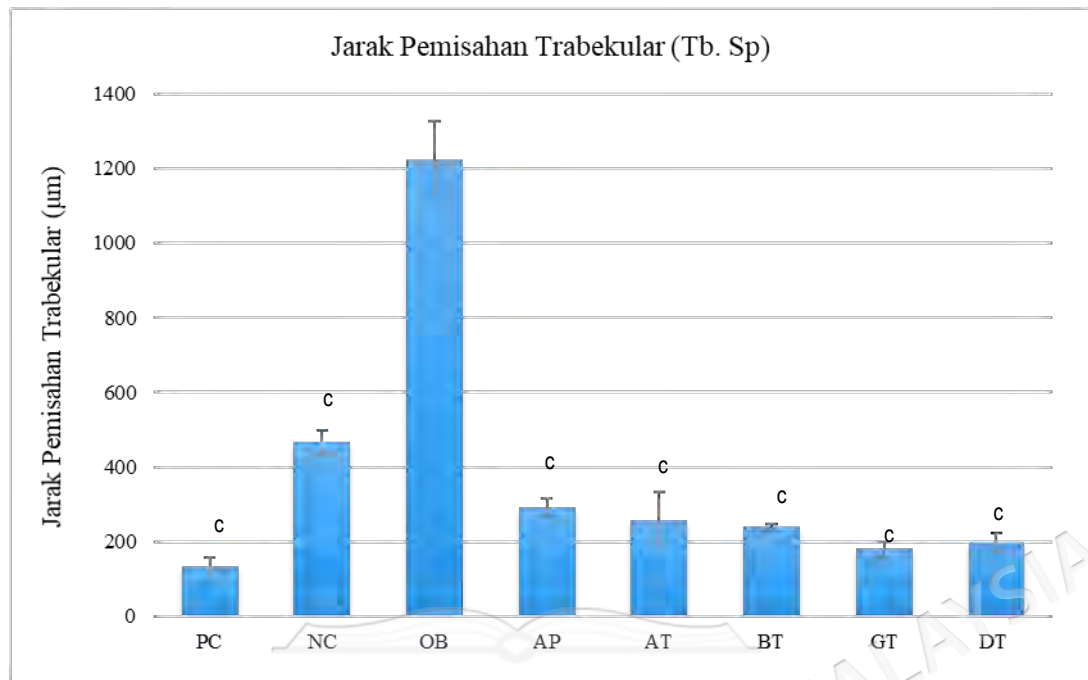
4.4.5 Jarak Pemisahan Trabekular (Tb. Sp)

Kesan rawatan isomer vitamin E terhadap jarak pemisahan trabekular ditunjukkan dalam Rajah 4.7 dan Mikrofotograf 4.3. Kesemua rawatan vitamin E tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan berbanding kumpulan tulang osteoporosis (OB), kawalan negatif (NC) dan kawalan positif (PC).



Rajah 4.6 Graf perbandingan bilangan trabekular dengan kumpulan rawatan isomer vitamin E. Nilai dinyatakan dalam bentuk $\text{min} \pm \text{SEM}$, (n=6)

- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan positif (PC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan negatif (NC)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan tulang osteoporotik (OB)
- d menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan β -tokotrienol (BT)
- g menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)



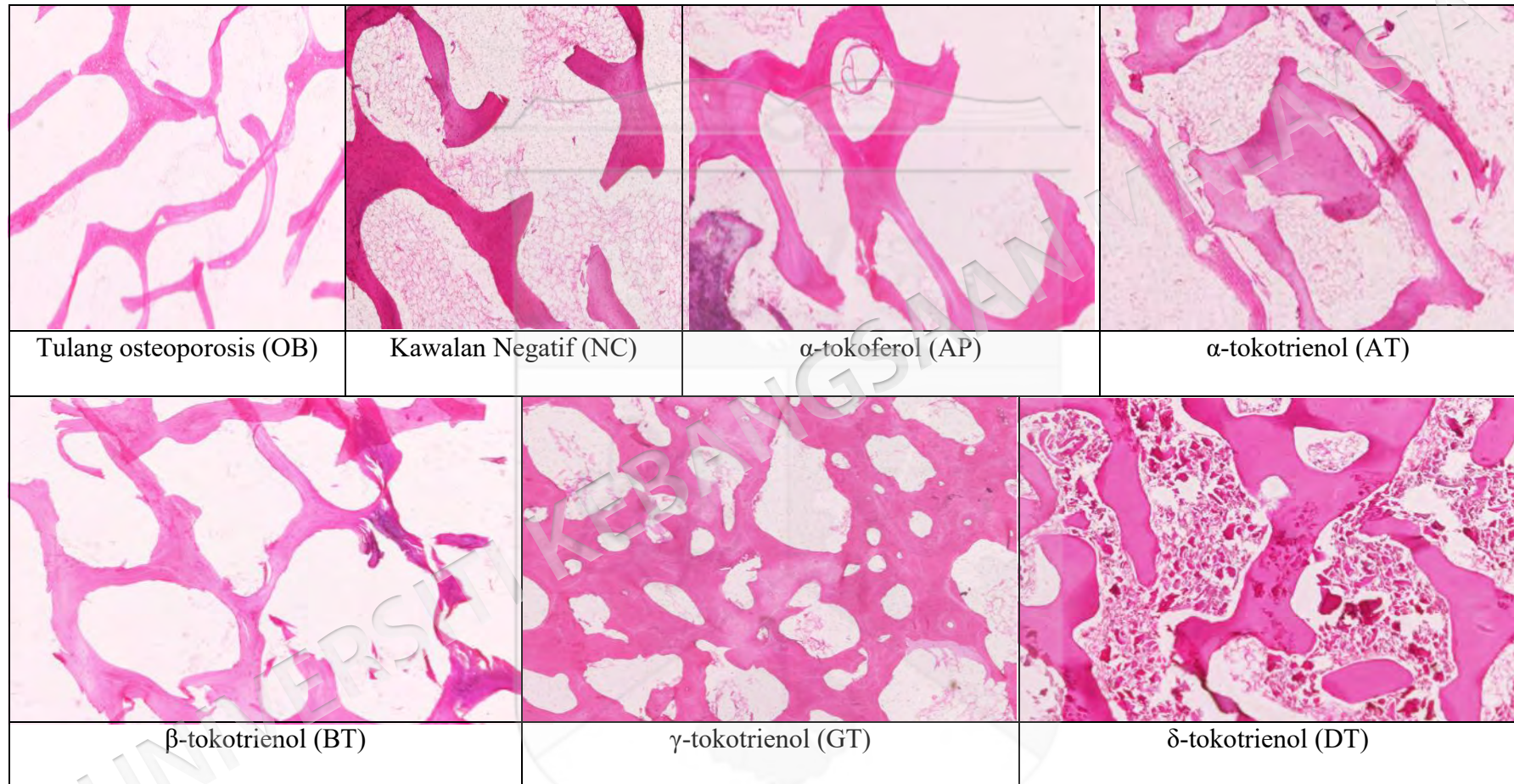
Rajah 4.7 Graf perbandingan nilai purata jarak pemisahan trabekular bagi semua kumpulan rawatan. Nilai dinyatakan dalam bentuk min + SEM, (n=6)

- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan positif (PC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan negatif (NC)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan tulang osteoporotik (OB)
- d menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan β -tokotrienol (BT)
- g menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)

B. Histomorfometri Statik

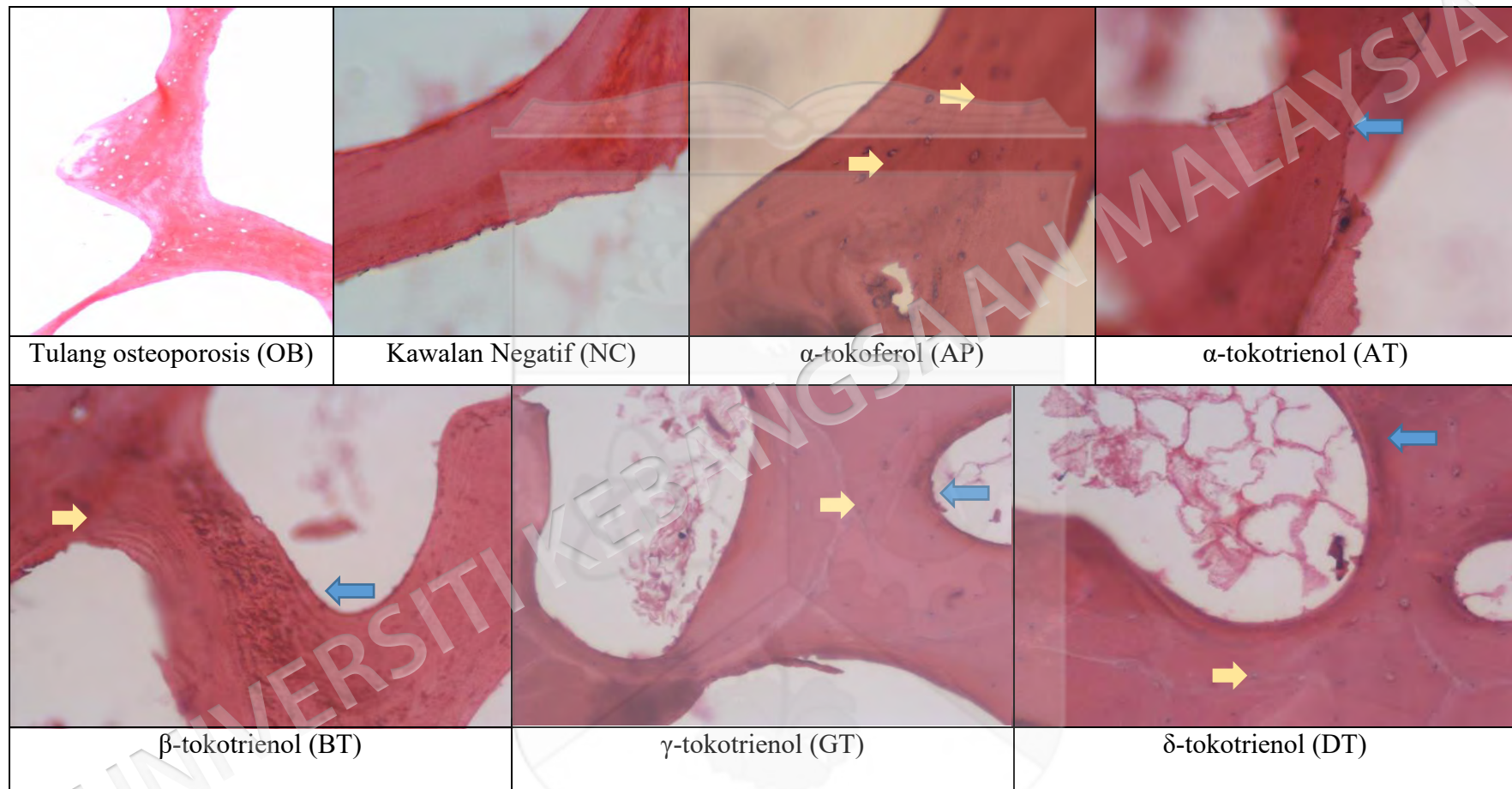
4.4.6 Histomorfometri Statik (Pewarnaan Hematoksilin Dan Eosin)

Pemerhatian pada Mikrofotograf 4.4 menunjukkan perbezaan ketebalan trabekular bagi setiap rawatan. Sel osteoblas diwarnakan dengan keungguan manakala trabekular diwarnakan dengan warna merah jambu. Trabekular OB kelihatan lebih nipis berbanding NC. Ukuran trabekular juga dilihat kurang tebal pada NC serta AP dibandingkan dengan AT dan BT. Manakala tulang trabekular dilihat lebih tebal pada kumpulan GT dan DT berbanding kumpulan rawatan isomer vitamin E yang lain. Kumpulan GT menunjukkan ukuran trabekular yang paling tebal dibandingkan antara semua rawatan vitamin E dan diikuti dengan DT. Pemerhatian tulang OB di bawah objektif pembesaran 20x mendapati matriks diwarnakan dengan warna merah jambu. Sel pada sum-sum tulang serta osteosit telah disingkirkan dan tiada nukleus yang diwarnakan. Pemerhatian slaid pada NC, AP, AT, BT, GT dan DT mendapati terdapat kehadiran sel osteoblas dan sel osteosit di warnakan dalam keratas rentas perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E. Pemerhatian ini merujuk kepada Mikrofotograf 4.5.



Mikrofotograf 4.4

Mikrofotograf Pewarnaan hematoksilin dan eosin pada perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E. Tanda panah hitam menunjukkan kawasan trabekular dengan pembesaran x10



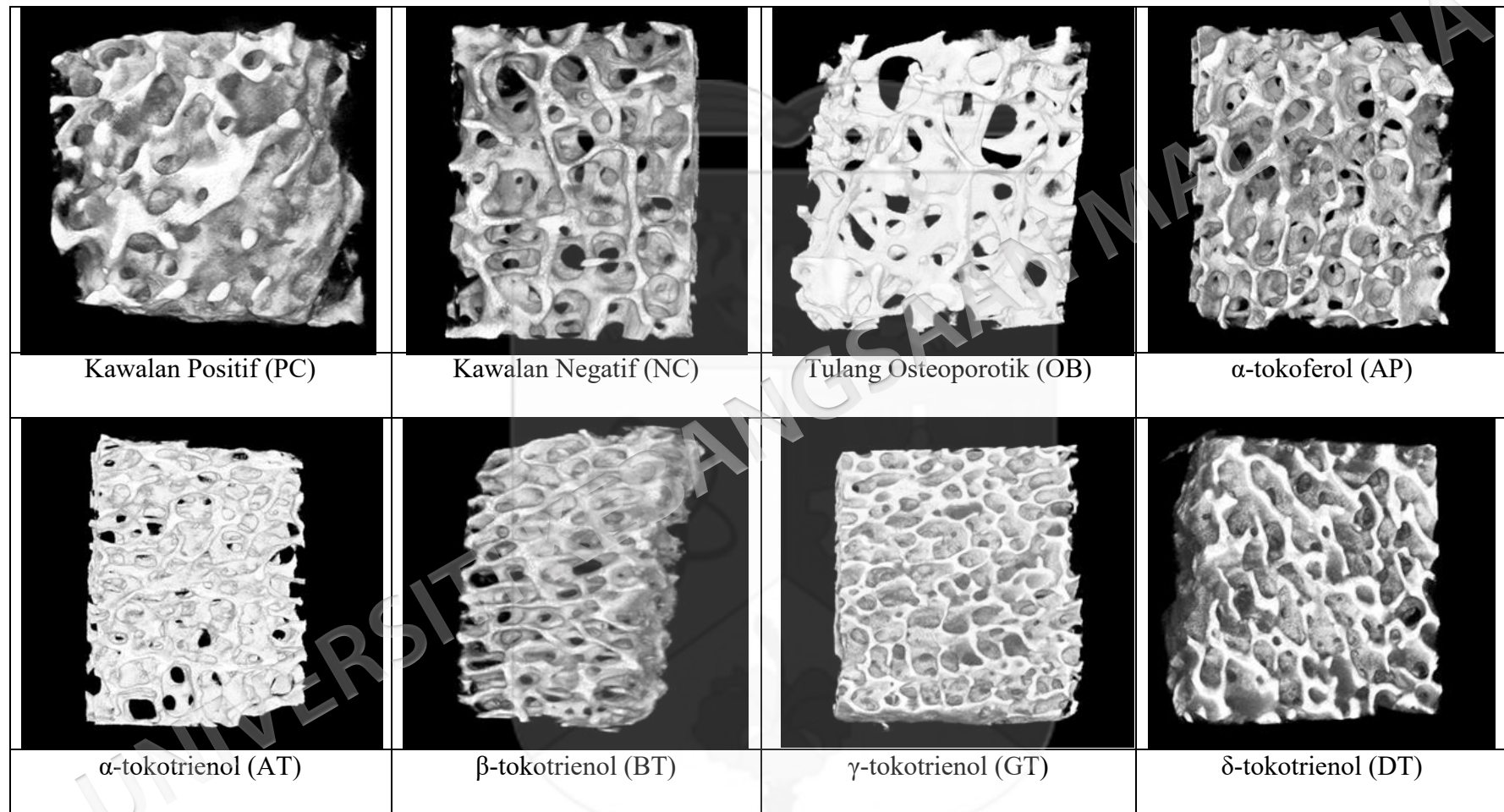
Mikrofotograf 4.5.

Pewarnaan hematoksilin dan eosin pada perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E. Tanda panah kuning menunjukkan pada sel osteosit dan tanda panah biru adalah sel osteoblas dengan pembesaran x20

4.5 IMBASAN TOMOGRAFI BERKOMPUTER (CT SCAN)

Mikrofotograf 4.6 menunjukkan imej daripada analisis imbasan tomografi berkomputer. Hasil analisis menunjukkan tulang PC kelihatan seperti span yang padat berbanding tulang NC dan OB. Tulang OB kelihatan mempunyai banyak rongga yang kosong dengan tulang trabekular yang lebih kecil berbanding tulang NC dan jarak pemisahan trabekular antara satu sama lain kelihatan lebih jauh berbanding tulang NC. Hasil kajian menunjukkan tulang pada kumpulan GT dan DT kelihatan lebih padat berbanding kumpulan rawatan isomer vitamin E yang lain. Saiz rongga pada kumpulan GT dan DT kelihatan lebih kecil berbanding kumpulan rawatan AP, AT dan BT. Perancah tulang lembu yang dirawat dengan GT kelihatan lebih padat diikuti dengan DT, BT, AT dan AP.





Mikrofotograf 4.6

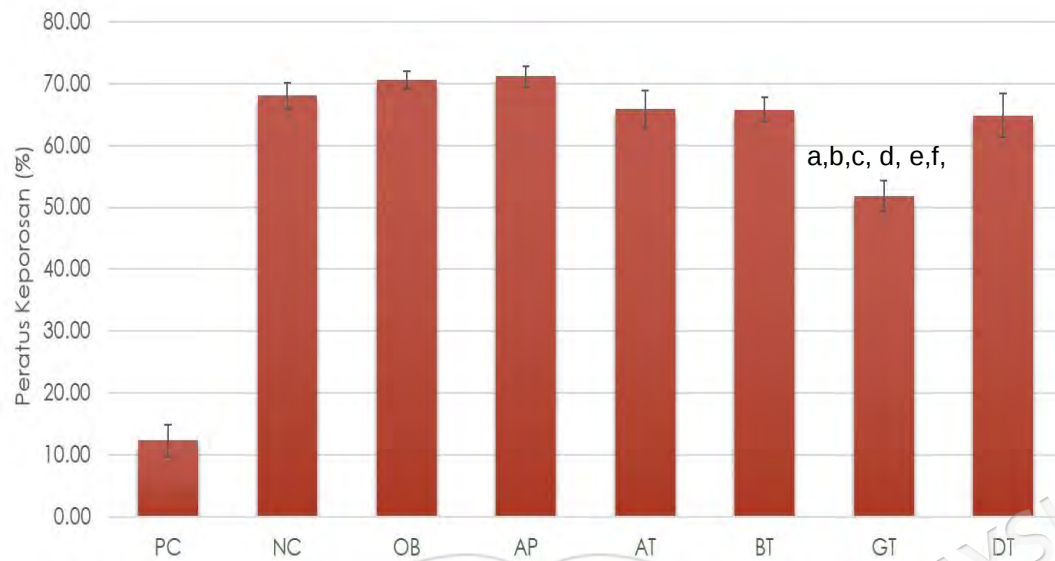
Mikrofotograf menunjukkan imej 3D daripada analisis gambaran tomografi berkomputer bagi perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E

4.5.1 Peratus Keporosan Trabekular

Kesan rawatan isomer vitamin E terhadap model tulang osteoporosis menggunakan imbasan mikrotomografi ditunjukkan di dalam Rajah 4.8 dan Mikrofotograf 4.6. Selepas 21 hari rawatan, imbasan tomografi berkomputer menunjukkan bahawa tiada penurunan signifikan antara kumpulan PC dibandingkan kumpulan OB dan NC. Tiada perubahan ketara juga antara kumpulan NC dan OB. Keputusan juga menunjukkan tiada penurunan keporosan yang signifikan bagi kumpulan NC dibandingkan dengan kumpulan rawatan tokotrienol dan tokoferol kecuali γ -tokotrienol. Kumpulan rawatan GT ($p < 0.05$) menurun secara signifikan berbanding kumpulan OB, NC serta PC. Namun begitu, tiada penurunan ketara kumpulan rawatan GT dibandingkan dengan kumpulan DT.

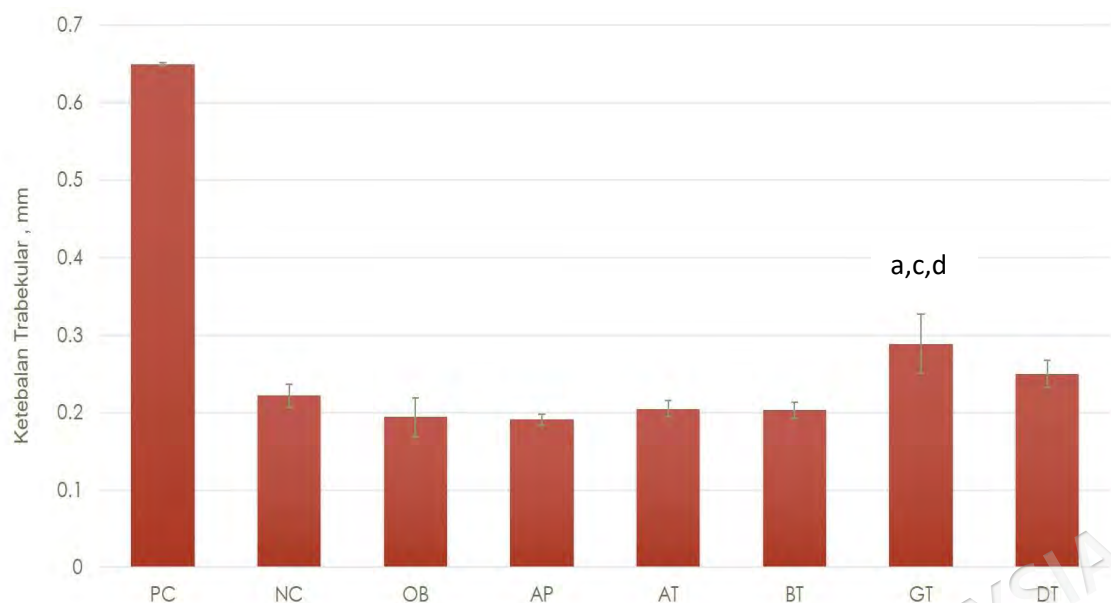
4.5.2 Ketebalan Trabekular

Hasil kajian menunjukkan tiada peningkatan signifikan bagi kumpulan PC dibandingkan dengan kumpulan NC dan OB. Tiada peningkatan ketara juga pada kumpulan OB dibandingkan dengan NC. Tiada peningkatan ketebalan trabekular yang signifikan kumpulan rawatan isomer vitamin E dibandingkan dengan kumpulan NC. Hasil kajian juga menunjukkan ketebalan trabekular meningkat secara signifikan pada kumpulan rawatan GT ($P < 0.05$) berbanding kumpulan OB dan PC. Namun begitu tiada peningkatan yang signifikan bagi kumpulan GT dibandingkan dengan DT. Hasil kajian ditunjukkan dalam Rajah 4.9 serta Mikrofotograf 4.6.



Rajah 4.8 Graf perbandingan keporosan setiap rawatan isomer vitamin E. Nilai dinyatakan dalam bentuk min + SEM, (n=6)

- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan positif (PC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan negatif (NC)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan tulang osteoporotik (OB)
- d menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan β -tokotrienol (BT)
- g menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)



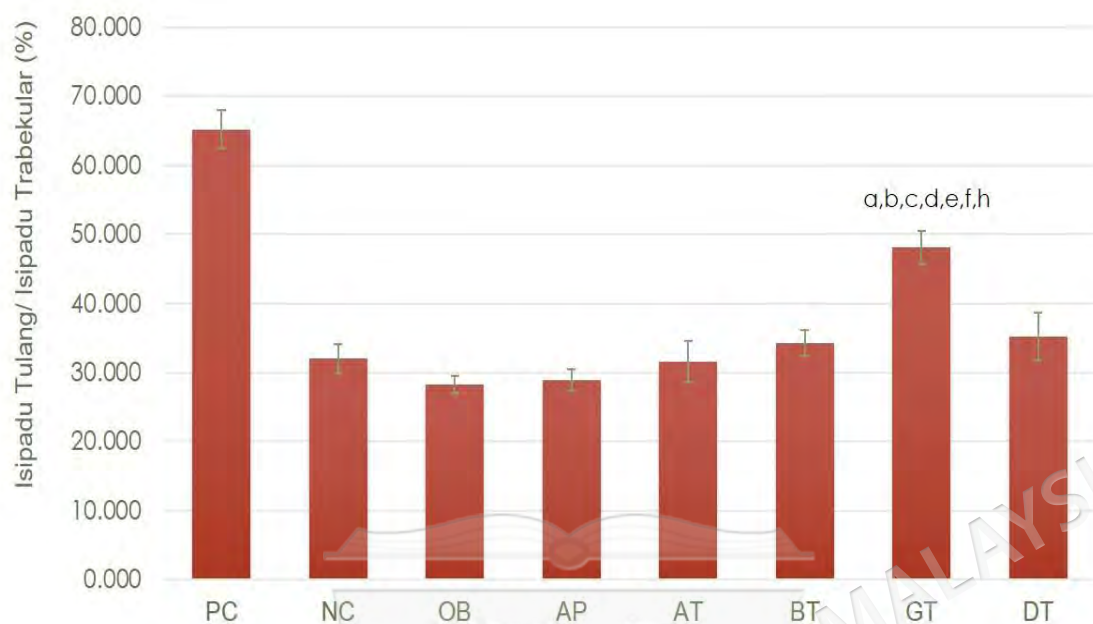
Rajah 4.9 Graf perbandingan ketebalan trabekular rawatan isomer vitamin E. Nilai dinyatakan dalam bentuk min + SEM, (n=6)

- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan positif (PC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan negatif (NC)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan tulang osteoporotik (OB)
- d menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan β -tokotrienol (BT)
- g menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)

4.5.3 Isipadu Tulang Trabekular (BV/TV)

Rajah 4.10 menunjukkan perbandingan peratusan isipadu tulang/ isipadu trabekular (BV/TV) akibat rawatan isomer vitamin E. Hasil kajian menunjukkan tiada peningkatan isipadu yang signifikan pada kumpulan NC berbanding OB. Hasil kajian menunjukkan peratusan isipadu meningkat dengan signifikan pada kumpulan GT ($P < 0.05$) berbanding kumpulan OB, NC serta PC. Namun begitu, tiada perbezaan yang signifikan dilihat pada kumpulan rawatan vitamin E yang lain. Isipadu tulang trabekular pada kumpulan GT menunjukkan peningkatan signifikan berbanding kumpulan DT. Hasil kajian ditunjukkan dalam Rajah 4.10 serta Mikrofotograf 4.6.





Rajah 4.10 Peratusan Isipadu tulang/ isipadu trabekular setiap rawatan isomer vitamin E. Nilai dinyatakan dalam bentuk min + SEM, (n=6)

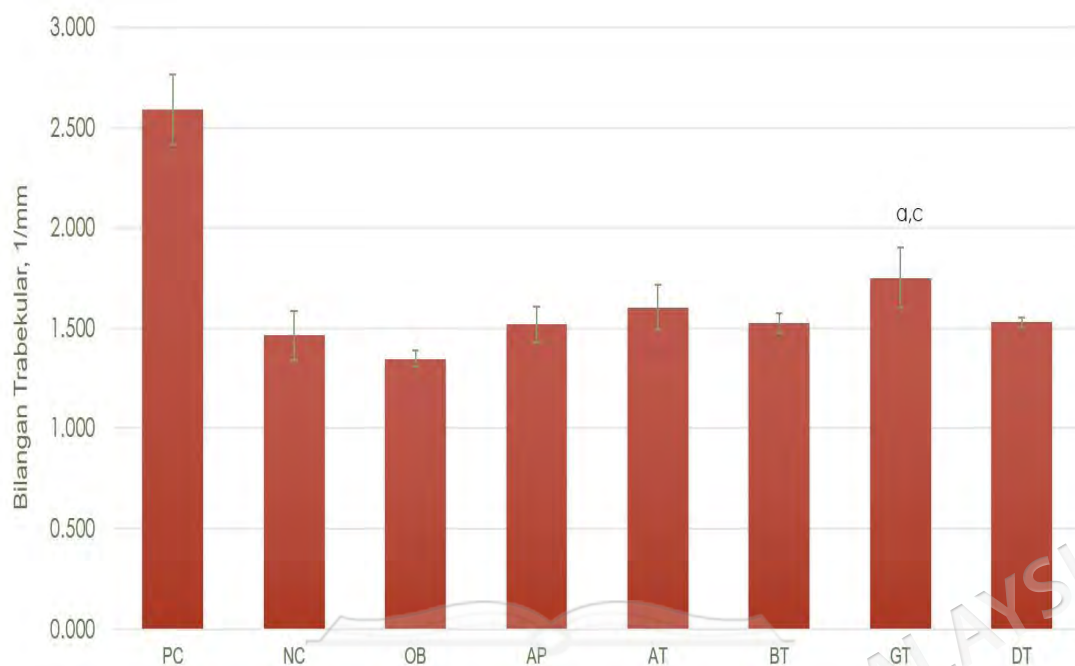
- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan positif (PC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan negatif (NC)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan tulang osteoporotik (OB)
- d menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan β -tokotrienol (BT)
- g menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)

4.5.4 Bilangan Trabekular (Tb. N)

Kesan rawatan isomer vitamin E terhadap bilangan trabekular ditunjukkan dalam Rajah 4.11 dan Mikrofotograf 4.6. Setelah 21 hari rawatan, tiada perubahan signifikan kumpulan NC dibandingkan dibandingkan dengan kumpulan OB. Hasil kajian menunjukkan perancah tulang lembu yang dirawat dengan γ -tokotrienol (GT) menunjukkan peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding dua kumpulan kawalan (OB dan PC). Walau bagaimanapun, tiada perubahan yang signifikan di antara kumpulan rawatan isomer vitamin E yang lain berbanding kumpulan kawalan, (NC dan PC) serta OB. Tiada peningkatan yang signifikan bagi kumpulan GT dibandingkan dengan kumpulan DT.

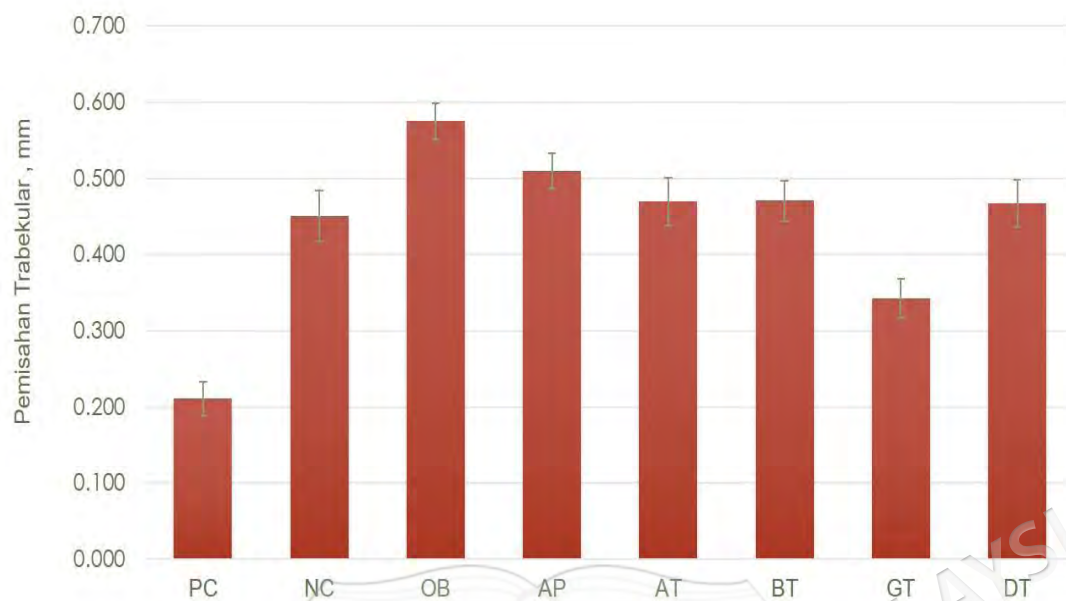
4.5.6 Pemisahan Trabekular (Tb. Sp)

Kesan rawatan isomer vitamin E terhadap jarak pemisahan trabekular ditunjukkan dalam Rajah 4.12 dan Mikrofotograf 4.6. Setelah 21 hari rawatan, tiada peningkatan yang signifikan pada kumpulan PC berbanding OB dan NC. Tiada peningkatan ketara NC berbanding OB. Selain itu, tiada peningkatan ketara semua perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E. Kumpulan GT tidak menunjukkan peningkatan ketara dibandingkan dengan kumpulan rawatan DT.



Rajah 4.11 Graf perbandingan bilangan trabekular bagi rawatan isomer vitamin E. Nilai dinyatakan dalam bentuk min + SEM, (n=6)

- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan positif (PC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan negatif (NC)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan tulang osteoporotik (OB)
- d menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan β -tokotrienol (BT)
- g menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)



Rajah 4.12 Graf jarak pemisahan trabekular bagi rawatan isomer vitamin E. Nilai dinyatakan dalam bentuk min + SEM, (n=6)

- a menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan positif (PC)
- b menunjukkan perbezaan signifikan dengan kawalan negatif (NC)
- c menunjukkan perbezaan signifikan dengan tulang osteoporotik (OB)
- d menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokoferol (AP)
- e menunjukkan perbezaan signifikan dengan α -tokotrienol (AT)
- f menunjukkan perbezaan signifikan dengan β -tokotrienol (BT)
- g menunjukkan perbezaan signifikan dengan γ -tokotrienol (GT)

BAB V

PERBINCANGAN

5.1 PENGKULTURAN SEL OSTEOLAS DAN PENYEDIAAN PERANCAH TULANG LEMBU.

Dalam kajian ini sel yang digunakan adalah sel osteoblas daripada fetus manusia hFOB 1.19. Sel hFOB 1.19 adalah sel yang homogen dan mampu berkembang dan membeza pada kadar yang normal. Sel ini menunjukkan penanda kepada fenotip osteoblas. Sel ini juga merupakan model yang sesuai untuk pemeriksaan tahap awal pembezaan osteogenik pada permukaan bahan. Oleh itu, sel hFOB 1.19 dipilih untuk dikulturkan pada perancah tulang lembu. Pengkulturan sel osteoblas hFOB 1.19 pada perancah tulang lembu dibuat dalam tempoh 21 hari. Tempoh 1 sehingga 3 hari adalah tempoh untuk berlakunya perkembangan dan migrasi sel setelah proses pencantuman antara sel osteoblas dan perancah tulang lembu. Tempoh 21 hari dipilih berdasarkan kajian yang telah dibuat oleh Knesser et al., pada tahun 2006. Hasil dapatan kajian melaporkan bahawa sel osteoblas berproliferasi dengan baik di dalam perancah dengan pelekatan sel osteoblas memenuhi perancah pada hari ke 14 kajian (Knesser et al. 2006).

Dalam pelbagai reka bentuk kajian, tulang daripada mamalia menjadi antara pilihan dalam kalangan penyelidik kerana tulang tersebut boleh menjadi model yang mewakili pertumbuhan semula tulang manusia dengan ciri anatomi dan morfologi, keupayaan dalam pemyembuhan, pembentukan semula tulang serta kepadatan mineral tulang (Aerssen et al. 1998). Satu kajian ada melaporkan bahawa perancah yang dihasilkan daripada tulang semulajadi daripada khinzir berhasil dikulturkan bersama sel osteoblas yang diekstrak daripada anab. Kajian tersebut melaporkan bahawa perancah

yang terhasil memberikan ruangan yang kondusif kepada sel untuk pelekatan dan berkembang dengan baik dalam matriks ekstra selular (Rui et al 2012). Kajian lain yang dibuat oleh Rashmi et al. 2017 mencadangkan perancah tulang lembu sesuai untuk dijadikan perancah kerana sifat biokompabilitinya yang membantu pelekatan dan percambahan sel dalam tempoh 14 hari pengkulturan secara *in vitro*.

Tulang yang dipilih untuk dijadikan perancah sebaik-baiknya menunjukkan persamaan dengan manusia dari segi pertimbangan fisiologi dan patologi serta membolehkan kajian di buat dalam tempoh masa yang singkat. Hasil perbandingan kajian yang pernah dibuat mendapati tulang mamalia menunjukkan kelebihan dari segi kurangnya tindak balas immunogenik serta berkebolehan dalam mengekalkan aktiviti biologi sel kerana strukturnya adalah struktur tulang asli (Vavken et al 2012).

Dalam kajian ini, pihak pengkaji memilih untuk menyediakan perancah tulang daripada tulang femur kaki lembu. Tulang lembu merupakan produk buangan dalam industri daging dan penternakan. Penggunaan tulang lembu untuk dijadikan perancah secara tidak langsung dapat meminimalkan penggunaan haiwan hidup dalam kajian dan mempromosi penggunaan sumber secara lestari. Bahagian yang dipilih adalah tulang trabekular kerana struktur span yang dimiliki oleh tulang ini. Bahagian ini juga dianggap sebagai model yang terbaik kerana mempunyai struktur Haversian seperti tulang manusia yang memberi nisbah permukaan dan isipadu yang lebih besar. Selain itu, tulang trabekular juga sesuai kerana topografi, ciri biokimia serta sokongan mekanikal untuk proliferasi dan pembezaan sel yang baik (Hauser et al. 2018). Tulang trabekular mempunyai kadar pembentukan semula tulang yang lebih tinggi berbanding tulang kortikal (Oftadeh et al. 2015). Perkara ini menjadikan tulang trabekular lebih mudah digunakan dalam kajian metabolisme tulang kerana sebarang perubahan dapat dilihat dalam jangka masa yang lebih pendek.

Menyedari tentang kurangnya kajian secara *in vitro* bagi melihat kesan isomer vitamin E pada tulang, pihak pengkaji mengambil pendekatan ini untuk membuat kajian bagi menentukan kesan antiosteoporosis dan kesan anabolik isomer vitamin E secara individu melalui adaptasi pembinaan perancah daripada tulang lembu. Buat masa ini, masih tiada data kajian yang melaporkan tentang kesan isomer vitamin E secara individu

dalam mengkaji kesan antiosteoporotik dan kesan anabolik vitamin E. Perbandingan data berkaitan isomer vitamin E dalam kajian 3D juga adalah terhad.

5.2 KEUPAYAAN DAN KEJAYAN SEL OSTEOLAS MELEKAT PADA PERANCAH TULANG LEMBU MELALUI IMBASAN MIKROSKOP ELEKTRON

Pengimbasan menggunakan mikroskop elektron penting dalam penyediaan perancah. Imej daripada mikroskop elektron dapat diaplikasikan untuk melihat keporosan sesuatu perancah. Salah satu faktor utama penentu kejayaan perancah adalah pelekatan sel pada perancah serta proliferasi sel pada permukaan perancah. Penghasilan perancah yang mempunyai keporosan yang tinggi serta ketumpatan rendah bertujuan untuk meningkatkan bilangan sel yang berupaya melalui ruangan perancah dan melekat. Hal ini akan memendekkan masa untuk pembentukan tisu tulang (Zhang et al 2003). Oleh itu, pengimbasan mikroskop elektron dalam kajian ini adalah untuk memastikan perancah yang dihasilkan mempunyai ukuran liang yang memuaskan.

Dalam kajian ini saiz purata keporosan yang diperolehi ialah 352 mikron. Keporosan yang tinggi membolehkan vaskularisasi nutrien dan penyebaran gas serta untuk pembuangan sisa oleh sel (LeGeros et al 1995; Mikos et al 1993). Sebilangan penyelidik melaporkan ukuran saiz liang adalah di antara 200 sehingga 500 mikron (Leong et al. 2003; Boyan et al. 1996), sementara kajian yang lain pula menyebut saiz liang yang sesuai adalah 500 mikron (Yoshikawa et al 1996). Saiz liang yang terlampau kecil akan menghalang pertumbuhan sel dan mineralisasi matriks tulang. Rustom et al (2016) serta Babaie dan Bhaduri (2017) mencadangkan bahawa penghasilan perancah yang ideal diperolehi melalui pembuatan perancah dengan saiz liang yang berbeza dengan campuran saiz makro dan mikro. Bahan perancah perlu menyerupai tulang trabekular atau kortikal yang akan memberi panduan sebenar pertumbuhan tulang dan penyembuhan semula tulang.

Dalam kajian ini, permukaan tulang perancah PC kelihatan licin dengan permukaan yang sekata dan tiada pori yang kelihatan. Manakala bagi permukaan tulang perancah OB dan NC mempunyai permukaan yang tidak rata, berpori dengan saiz yang pelbagai. Tulang OB mempunyai permukaan yang lebih kasar dan tidak rata dengan saiz

pori yang lebih besar berbanding tulang NC. Perancah NC yang mempunyai saiz pori yang lebih kecil dan permukaan yang kurang kasar dan lebih rata. Perkara ini menunjukkan terdapat perlekatan sel osteoblas pada kawasan pori perancah NC. Hasil kajian ini menunjukkan berlaku percambahan sel yang baik pada perancah tulang lembu yang tidak dirawat tanpa memerlukan rangsangan osteoinduktif tambahan. Kajian ini selari dengan penemuan yang dibuat oleh Koroupis et al (2013) yang melaporkan berlaku migrasi sel yang baik pada perancah tulang dalam media lengkap (Koroupis et al. 2013).

Semua tulang perancah yang dirawat dengan isomer vitamin E dilitupi dengan sel osteoblas berbanding dengan kumpulan kawalan negatif. Kajian ini juga menunjukkan pada hari ke 7, perancah tulang lembu yang dirawat dengan γ - dan δ -tokotrienol mempunyai timbunan sel yang lebih banyak berbanding permukaan perancah yang dirawat dengan isomer vitamin E yang lain. Hasil kajian oleh Oliveira dan rakan-rakan (2009) melaporkan bahawa pada hari ke 7 sel osteoblas telah berjaya menutupi pori pada perancah di mana sel-sel osteoblas kelihatan melekat dengan kuat dan memberi kesan rata pada permukaan perancah (Oliveira et al. 2009). Hasil kajian juga menunjukkan pelekatan sel osteoblas fetus manusia (hFOB 1.19) pada semua permukaan perancah yang dirawat dengan vitamin E. Hal ini menandakan bahawa sel perancah tersebut tidak memberikan kesan sitotoksik kepada sel osteoblas fetus manusia (hFOB 1.19) dan memberikan daya lekatan yang baik antara perancah dan sel. Pelekatan sel osteoblas pada permukaan perancah melibatkan interaksi molekul biologi yang mendorong kepada transduksi isyarat serta tindak balas sel. Lekatan sel osteoblas dan matriks akan saling berhubungan di mana filamen sel dan matriks aktin yang akan membawa kepada lekatan sel dan matriks yang lebih kuat (Gutiérrez-Prieto et al. 2019). Hasil kajian Gutiérrez-Prieto et al (2019) mendapati bahawa bahan terbaik untuk penyediaan permukaan yang sesuai untuk lekatan sel osteoblas adalah daripada bahan tulang lembu diikuti dengan hidroksiapatit, silikon serta kolagen.

Hasil daripada imbasan mikroskop didapati perancah yang telah dinyahkalsium mempunyai ukuran liang yang lebih besar daripada kumpulan perancah tulang asli dan perancah-perancah yang dirawat dengan isomer vitamin E. Perancah tulang yang dirawat dengan γ - dan δ -tokotrienol menunjukkan timbunan lekatan sel yang lebih banyak berbanding kumpulan rawatan isomer vitamin E yang lain (Mikrofotograf 4.2). Perkara

ini menunjukkan bahawa isomer γ - dan δ -tokotrienol adalah paling berkesan memperbaiki keporosan tulang akibat proses nyahkalsium yang menghasilkan tulang osteoporotik.

5.3 PENENTUAN DAN PEMILIHAN KEPEKATAN RAWATAN ISOMER VITAMIN E

Ujian asai viabiliti dijalankan bagi menentukan dos isomer vitamin E yang selamat dan berkesan ke atas sel osteoblas fetus manusia, hFOB 1.19. Asai viabiliti MTS akan menentukan peratusan sel hidup melalui penentuan penghasilan formazan melalui tindakan metabolik sel setelah didedahkan kepada sesuatu bahan kajian dalam tempoh masa yang tertentu. Dalam kajian ini, asai viabiliti sel dijalankan dalam sela masa rawatan selama 24 jam. Tempoh 24 jam selepas rawatan adalah tempoh untuk proliferasi sel osteoblas meningkat dengan pesat sehingga pertumbuhan yang maksimum (konfluen) (Quarles et al. 1992).

Hasil kajian menunjukkan kepekatan α -tokoferol serta isomer-isomer tokotrienol yang digunakan tidak menunjukkan kesan sitotoksik ke atas sel osteoblas hFOB 1.19 pada semua kepekatan yang digunakan, iaitu 10, 100 dan 1000 nM. Kajian juga menunjukkan isomer γ - dan δ -tokotrienol telah meningkatkan viabiliti sel berkadaran dengan pertambahan kepekatan isomer vitamin E.

Dalam kajian ini kami menggunakan kepekatan pertengahan, iaitu 100 nM untuk meneruskan kajian yang selanjutnya bagi memastikan kesan anabolik vitamin E dapat dilihat relevan secara fisiologinya. Keputusan ini selari dengan hasil oleh Mangialasche et al. pada tahun 2012 yang melaporkan bahawa kepekatan jumlah tokotrienol adalah sekitar 100 nmol/mmol jumlah kolesterol. Kajian terdahulu berkaitan keselamatan tokotrienol pada sel osteoblas yang dikultur secara konvensional melaporkan julat selamat kepekatan α -tokoferol adalah sehingga 200 μ M (Soeta et al. 2010), 8 μ M untuk γ -tokotrienol (Xu et al 2018), 25 μ M untuk δ -tokotrienol (Shah & Yagenehjoo 2019), dan 1 μ g untuk campuran annatto tokotrienol (Wan Hassan et al. 2018).

Namun, Mazlan et al (2006) menyatakan bahawa kepekatan dos γ -yang tinggi boleh menyebabkan ketoksikan kepada sel astrosit. Walau bagaimanapun, terdapat dua perkara yang perlu dipertimbangkan daripada hasil kajian ini. Pertamanya, kajian mereka menggunakan jenis sel yang berbeza dan kebanyakan sel adalah berasal daripada tikus. Sehubungan itu, kepekatan dos vitamin E yang optimum mungkin berbeza dengan kajian yang telah diusahakan oleh pihak kami. Keduanya adalah isomer vitamin E yang digunakan mungkin berbeza dengan kepekatan isomer vitamin E di dalam tisu tulang. Sehubungan itu, data yang tersedia ada berkaitan isomer vitamin E terutamanya tokotrienol dalam tisu tulang adalah amat terhad.

5.4 PENANDA BIOKIMIA BAGI RAWATAN VITAMIN E KE ATAS PERANCAH TULANG LEMBU

Aktiviti ALP merupakan penanda utama biokimia bagi mengesan aktiviti osteoblas. Kajian terdahulu menunjukkan peningkatan aktiviti ALP selama dalam tempoh 5-15 hari (Wang et al 2012). Semasa tempoh pembezaan sel, ALP akan diekspresikan dalam peringkat pematangan maktriks ekstrasel. Peringkat ini biasanya berlaku 5 hingga 15 hari semasa proses proliferasi (Wang et al 2012). Kajian terdahulu juga melaporkan aktiviti ALP oleh sel hFOB 1.19 meningkat dengan masa dan memuncak pada hari ke 12 (Hapidin et al. 2015). Oleh itu, kajian ini mengambil kira hal tersebut dan memilih pengukuran aktiviti ALP dibuat mengikut sela masa pada hari ke 3, ke 7 dan hari ke 15. Pemilihan ini dibuat selari dengan kajian yang dibuat oleh Chung et al. pada tahun 2017 dan Wang et al (2012). Kajian lain juga melaporkan ekspresi ALP lebih tinggi pada peringkat awal pembezaan sel osteoblas dan ini menandakan bermulanya proses mineralisasi. Ekspresi aktiviti ALP ini akan memuncak sekitar hari ke 15 hingga ke 16 dan mula menurun semasa pematangan sel osteoblas (Zhang et al 2010).

Hasil kajian yang dibuat mendapati bahawa kesemua perancah tulang lembu bagi kawalan negatif dan yang dirawat dengan isomer-isomer vitamin E menunjukkan peningkatan aktiviti ALP bermula pada hari ke 3 sehingga ke 15. Aktiviti ALP juga meningkat secara signifikan pada semua kumpulan rawatan isomer vitamin E pada sela masa ke 7 dan 15 berbanding pada hari ke 3. Pada sela masa hari ke 3 tiada peningkatan signifikan pada semua kumpulan rawatan isomer vitamin E. Perkara ini menunjukkan

semua kumpulan rawatan berkembang secara homogenous dan pematangan sel osteoblas juga berlaku secara seragam.

Pada hari ke 7 dan 15, semua kumpulan rawatan isomer meningkat secara signifikan berbanding kumpulan kawalan. Pada hari ke 15, kumpulan rawatan γ - dan δ -tokotrienol menunjukkan peningkatan ALP yang lebih ketara berbanding kumpulan rawatan isomer vitamin E yang lain. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa rawatan isomer vitamin E mempercepatkan penghasilan aktiviti ALP berbanding kawalan. Kajian ini juga menunjukkan peningkatan aktiviti ALP lebih ketara pada sel yang telah dirawat dengan γ - dan δ -tokotrienol berbanding isomer vitamin E yang lain. Justeru itu, γ - serta δ -tokotrienol menunjukkan potensi mereka dalam meningkatkan pembezaan sel osteoblas. Keputusan ini selari dengan kajian sebelumnya yang menunjukkan δ -tokotrienol telah meningkatkan ekspresi ALP dalam pre-osteoblas MC3T3-E1 (Shah & Yeganehjo 2019). Kajian lain juga menunjukkan bahawa pre-osteoblas MC3T3 –E1 yang telah dirawat dengan campuran annatto tokotrienol (90% δ -tokotrienol dan 10% γ -tokotrienol) meningkatkan ekspresi gen ALP (Wan Hassan et al. 2018). Hasil kajian ini membuktikan bahawa kesemua kumpulan rawatan dapat meneruskan aktiviti osteoblas ke peringkat mineralisasi.

Osteokalsin adalah protein bukan kolagen yang paling banyak di dalam matriks ekstraselular tulang. Osteokalsin memainkan peranan penting dalam mengawalatur proses pemineralan. Osteokalsin dihasilkan oleh sel osteoblas matang semasa pembentukan tulang dan bertindak mengawalatur proses pemineralan (Szulc & Bauer 2013). Kajian yang dibuat oleh Martinez dan rakan-rakan (1998) mencadangkan bahawa penghasilan osteokalsin menjadi penanda kepada proses resorpsi. Ini menyokong hipotesis yang dibuat oleh Glowacki yang menyatakan bahawa osteokalsin berfungsi sebagai isyarat matriks dalam peringkat penyerapan tulang (Glowacki et al. 1991)

Hasil kajian menunjukkan osteokalsin dihasilkan mulai hari ke 7 dan pola mulai meningkat sehingga hari ke 14 kemudian menunjukkan sedikit penurunan pada sela masa ke 21. Pada hari ke 7, 14 dan hari ke 21, semua rawatan isomer vitamin E meningkat secara signifikan berbanding kumpulan kawalan. Pada hari ke 7, 14 dan hari ke 21, kumpulan rawatan γ - dan δ -tokotrienol menunjukkan peningkatan yang signifikan

berbanding kumpulan rawatan isomer vitamin E yang lain. Namun begitu, tiada peningkatan ketara antara γ - dan δ -tokotrienol dalam sela masa ke 7, 14 dan 21. Kajian ini juga menunjukkan penghasilan osteokalsin oleh hFOB 1.19 dibantu oleh rawatan isomer vitamin E di mana γ - serta δ -tokotrienol menunjukkan peningkatan ketara berbanding isomer vitamin E yang lain. Hasil kajian ini menyokong kajian yang dibuat Wan Hassan dan rakan-rakan dimana, kajian tersebut menunjukkan campuran δ -tokotrienol dan γ -tokotrienol telah berjaya meningkatkan ekspresi gen serta protein osteokalsin oleh sel selanjut tikus, MC3T3-E1 (Wan Hassan et al. 2018). Peningkatan ekspresi osteokalsin dalam kajian ini menandakan bahawa rawatan isomer vitamin E membantu pematangan sel osteoblas.

Selain itu, peningkatan ALP bersama-sama osteokalsin yang dilihat selepas sela masa 7 hari berupaya mengaruh kepada nukleasi kristal pada endapan kalsium dalam pembentukan hidroksiapatit. Matriks tulang yang matang saling berkaitan dengan paras ekspresi ALP, protein bukan kolagen seperti osteoklasin dan osteopontin (Watherholt et al. 2012). Seterusnya sel osteoblas akan terbenam di dalam matrik ekstrasel. Hasil kajian ini telah menunjukkan bahawa rawatan isomer vitamin E terutamanya γ - serta δ -tokotrienol telah meningkatkan osteokalsin yang menggalakkan proses pemineralan. Secara keseluruhannya, semua kumpulan rawatan dapat merangsang proses pembentukan tulang dari peringkat proliferasi sel sehinggalah proses pemineralan. Rawatan γ -tokotrienol serta δ -tokotrienol dilihat paling berkesan dalam merangsang proses pembentukan dan pemineralan tulang.

5.5 ANALISA HISTOMORFOMETRI STRUKTUR PERANCAH TULANG LEMBU

Analisa histomorfometri adalah elemen penting dalam memproses analisis dan penilaian gambar bagi pengukuran kuantitatif struktur tulang. Dalam kajian ini penilaian histomorfometri struktur tulang dibuat bagi melihat kesan rawatan isomer vitamin E ke atas struktur mikro perancah. Hasil kajian yang diperolehi menunjukkan bahawa perancah tulang lembu model osteoporosis (OB) menunjukkan penurunan isipadu tulang trabekular (BV/TV), dan bilangan trabekular yang signifikan berbanding perancah kawalan positif (PC) dan kawalan negatif (NC).

Kajian ini mengkaji kumpulan kawalan OB dan NC untuk melihat kesan histomorfometrik pada perancah tulang lembu yang diaruhkan dengan osteoporosis di dalam media tanpa sebarang rawatan isomer. Selain itu, pihak pengkaji juga ingin mengetahui keupayaan sel osteoblas yang disuntik untuk melekat baik pada perancah NC. Hasil kajian mendapati terdapat peningkatan ketara isipadu tulang/isipadu trabekular dan bilangan trabekular dan ketebalan tulang pada perancah NC dibandingkan dengan perancah OB. Hasil kajian ini menunjukkan sel osteoblas yang disuntik pada tulang perancah OB bercambah dengan baik dalam media. Namun tidak menunjukkan peningkatan yang ketara berbanding tulang kawalan negatif.

Kajian mendapati kumpulan rawatan γ - dan δ -tokotrienol menunjukkan peningkatan yang signifikan berbanding NC dalam peratusan isipadu tulang/ isipadu trabekular. Kumpulan rawatan γ - dan δ -tokotrienol juga meningkat secara signifikan berbanding kumpulan isomer vitamin E yang lain. Namun begitu tiada peningkatan ketara bagi kumpulan γ - berbanding δ -tokotrienol dari segi peratusan isipadu tulang/ isipadu trabekular. Hasil dapatan menunjukkan rawatan γ - dan δ - tokotrienol telah membantu mengembalikan isipadu perancah tulang lembu.

Disamping itu, hasil kajian ini juga menunjukkan kesemua rawatan isomer vitamin E kecuali α -tokotrienol meningkatkan ketebalan trabekular dengan ketara berbanding kumpulan kawalan negatif. Kumpulan rawatan γ - dan δ -tokotrienol menunjukkan peningkatan yang signifikan berbanding rawatan isomer vitamin E yang lain. Namun begitu tiada perbezaan yang ketara bagi kumpulan rawatan γ -tokotrienol dan δ -tokotrienol. Kesemua kumpulan rawatan isomer vitamin E kecuali δ -tokotrienol menunjukkan peningkatan ketebalan trabekular yang signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif. Namun demikian, tiada perbezaan ketara dari segi bilangan trabekular berbanding isomer vitamin E.

Hasil analisis histomorpometri struktur menunjukkan perancah tulang lembu yang dirawat dengan γ - serta δ -tokotrienol telah membantu menngembalikan isipadu tulang dan meningkatkan ketebalan trabekular tulang. Perkara ini menunjukkan bahawa sel osteoblas yang matang telah mensintesis matriks dan berlaku proses mineralisasi. Oleh

kerana ini adalah kali pertama kesan tokotrienol dikultur pada perancah tulang lembu, maka perbandingan dilakukan dengan kajian *in vivo* sebelum ini. Hasil kajian Shuid et al. (2010) melaporkan γ -tokotrienol meningkatkan parameter histomorfometrik struktur tulang tikus normal dan kesan anaboliknya adalah lebih tinggi daripada α -tokoferol pada dos yang sama. Kajian yang dilaporkan oleh Smith dan rakan-rakan juga mendapati bahawa suplementasi α -tokoferol dengan dos yang berbeza tidak memberi sebarang kesan terhadap parameter histomorfometri tulang tikus (Smith et al. 2005).

Kajian juga menunjukkan jarak pemisahan kesemua perancah tulang lembu yang dirawat dengan tokotrienol dan tokoferol menurun secara signifikan berbanding kumpulan OB. Hal ini disebabkan oleh peningkatan isipadu trabekular tulang (BV/TV), ketebalan trabekular serta bilangan trabekular. Peningkatan parameter ini telah membantu meningkatkan pembentukan tulang dan mengurangkan ruangan pemisahan di antara trabekular. Kajian terdahulu menunjukkan bahawa annatto tokotrienol (campuran δ -tokotrienol dan γ -tokotrienol) membantu meningkatkan indeks histomorfometri tulang tikus yang kekurangan androgen (Chin & Ima-Nrwana 2014). Hasil kajian yang dibuat oleh Hermizi et al. (2009) menggunakan model tikus osteoporosis yang diaruh dengan nikotin menunjukkan γ -tokotrienol berjaya mengembalikan ketebalan trabekular dan meningkatkan bilangan trabekular berbanding rawatan menggunakan campuran isomer-isomer tokotrienol ataupun tokoferol.

Pewarnaan von Kossa dibuat bagi melihat gambaran mineralisasi seperti kalsium dan fosfat pada tisu. Pewarnaan von Kossa pada tulang kawalan positif menunjukkan intensiti warna adalah amat gelap dengan saiz trabekular yang paling tebal berbanding tulang osteoporotik (OB) dan kawalan negatif (NC). Perkara ini menunjukkan kandungan kalsium yang tinggi pada tulang normal dan tidak di aruh dengan osteoporosis. Tulang OB menunjukkan intensiti warna yang lebih cerah berbanding tulang NC. Hal ini kerana tulang OB telah mengalami nyahkalsium dan tidak dirawat dengan sebarang rawatan. Tulang NC menunjukkan intensiti warna yang lebih gelap berbanding OB ini kerana perancah tersebut telah disuntik dengan sel osteoblas dan terdapat perlekatan sel di dalam perancah.

Hasil pewarnaan pada kumpulan AP serta NC kelihatan kurang tebal berbanding kumpulan AT dan BT. Saiz trabekular juga kurang tebal berbanding kumpulan AT dan BT. Keputusan ini menunjukkan komposisi kalsium pada AP dan NC adalah kurang berbanding AT dan BT. Hasil daripada pewarnaan von kossa menunjukkan tulang perancah yang dirawat dengan γ - dan δ -tokotrienol mempunyai ketebalan trabekular yang lebih tinggi berbanding kumpulan rawatan lain. Intensiti warna lebih gelap menandakan terdapat kandungan kalsium yang lebih tinggi di kawasan perancah yang dirawat dengan γ - serta δ -tokotrienol. Kandungan sel osteoblas yang banyak akan menyimpan mineral kalsium yang lebih tinggi dan ini menghasilkan warna trabekular akan kelihatan lebih gelap berbanding kumpulan rawatan yang lain.

Hasil pewarnaan hematoxilin menunjukkan saiz trabekular pada OB adalah lebih nipis berbanding NC. Pemerhatian pada tulang OB menunjukkan tiada kehadiran osteosit atau sel pada slaid. Ini membuktikan bahawa perancah OB telah berjaya diaruh dengan keadaan osteoporosis. Penyingkiran sel osteosit berlaku akibat proses nyahkalsium serta penyingkiran sel sewaktu proses penghasilan perancah. Hasil keputusan ini selari dengan hasil kajian yang dibuat oleh Bracey et al. (2018) yang melaporkan bahawa protokol mereka dalam penghasilan perancah tulang berkesan menyingkirkan sel berdasarkan keputusan pengurangan 98% kandungan DNA sel. Hasil pewarnaan hematoxilin menunjukkan ketebalan saiz trabekular bagi kumpulan rawatan isomer vitamin E adalah lebih tebal berbanding kumpulan kawalan negatif. Kumpulan rawatan α -tokotrienol menunjukkan ketebalan trabekular yang hampir sama dengan kawalan negatif dan α - tokoferol. Kumpulan rawatan γ -tokotrienol dan δ -tokotrienol menunjukkan saiz trabekular yang tebal dan jaringan trabekular yang lebih banyak berbanding kumpulan rawatan isomer vitamin E yang lain. Pemerhatian juga mendapati terdapat penghasilan sel osteoblas yang baru sertaompokan sel pada bahagian tepi trabekular rawatan. Pemerhatian mendapati lebih banyak sel osteoblas yang dilihat pada perancah yang dirawat dengan γ - dan δ -tokotrienol. Hasil ini disokong lagi dengan hasil pewarnaan Von kossa yang diperolehi daripada hasil kajian ini.

Hasil kajian ini selari dengan kajian konvensional yang dibuat melalui kaedah 2D dimana berlaku peningkatan pembentukan nodul kalsium pada sel osteoblas yang dirawat dengan kombinasi γ - dan δ -tokotrienol (Wan Hasan et al. 2018; Xu et al. 2018). Rawatan α -tokotrienol, β -tokotrienol serta α -tokoferol dilihat kurang menonjol dalam memberi kesan pembentukan semula tulang. Penemuan daripada kajian ini menunjukkan bahawa α -tokoferol dan α -tokotrienol tidak menunjukkan kesan, β -tokotrienol menunjukkan kesan sederhana manakala γ -tokotrienol dan δ -tokotrienol mempunyai kesan paling baik. γ - dan δ -tokotrienol berperanan dan bertanggungjawab dalam memelihara mikro struktur tulang dan pada masa yang sama membantu aktiviti pembentukan tulang dan seterusnya mendorong kepada aktiviti pembezaan sel. Dapat dijelaskan juga bahawa rawatan γ - dan δ -tokotrienol mempercepatkan pembezaan seperti yang dapat dilihat daripada hasil analisis histomorfometri.

5.6 ANALISA TOMOGRAFI BERKOMPUTER (CT SCAN)

Tomografi berkomputer adalah teknik sinar-X yang memberikan penilaian terhadap ketumpatan, geometri dan imej 3D dengan resolusi tinggi bagi melihat struktur mikro pada tulang atau pun perancah. Kaedah penganalisaan tomografi dapat menganggar kualiti tulang baru yang terbentuk. Dengan menggunakan teknik pengukuran secara 3 D, pembahagian bersiri spesimen perancah tulang lembu dapat dibuat bagi membina gambaran 3D tulang perancah dengan resolusi yang tinggi.

Imej tomografi pada perancah tulang lembu menunjukkan geometri 3 Dimensi. Ciri pada gambaran tomografi dibuat berdasarkan keporosan perancah serta ukuran trabekular. Kumpulan osteoporotik (OB) menunjukkan peratusan keporosan yang tertinggi dengan bilangan trabekular, ketebalan trabekular yang terendah berbanding tulang PC dan NC. Hanya kumpulan rawatan γ -tokotrienol yang menunjukkan penurunan peratus keporosan berbanding kumpulan NC. Secara keseluruhannya, γ - tokotrienol menunjukkan penurunan peratus keporosan yang signifikan berbanding PC, OB, NC AP, AT, dan BT. Penemuan ini menunjukkan bahawa rawatan γ -tokotrienol secara signifikan telah menurunkan peratusan keporosan tulang berbanding rawatan isomer vitamin E yang lain. Namun begitu, tiada perbezaan yang ketara bagi rawatan γ -tokotrienol berbanding δ -tokotrienol.

Hasil analisis tomografi selepas 21 rawatan menunjukkan tiada peningkatan ketara pada kumpulan PC berbanding kumpulan NC dan OB bagi parameter ketebalan trabekular, peratusan isipadu tulang/isipadu trabekular, bilangan trabekular dan jarak pemisahan trabekular. Hasil keputusan tomografi berkomputer yang dibuat oleh Bracey et al. (2019) mendapati bahawa perancah daripada tulang khinzir yang disuntik dengan sel osteoblas menunjukkan hasil rekrutan sel pada perancah. Hal ini menunjukkan bahawa berlaku proses pembentukan tulang baru secara spontan.

Hasil kajian juga menunjukkan hanya γ -tokotrienol yang menunjukkan peningkatan isipadu tulang/isipadu trabekular yang ketara berbanding kumpulan kawalan negatif. Tiada peningkatan signifikan berlaku pada semua parameter lain bagi rawatan isomer vitamin E berbanding NC. Malahan kajian juga menunjukkan isipadu trabekular, peratusan keporosan dan ketebalan trabekular bagi perancah tulang lembu yang dirawat dengan γ -tokotrienol meningkat dengan ketara berbanding dengan kumpulan rawatan isomer vitamin E yang lain. Perkara ini menandakan bahawa rawatan γ -tokotrienol membantu dalam meningkatkan perkembangan pembentukan tulang. Tambahan lagi, hasil kajian yang dibuat oleh Deng et al. (2014) menunjukkan tikus yang dirawat dengan suplementasi γ -tokotrienol meningkatkan mikrostruktur tulang, jisim mineral tulang serta histomorfometri tulang. Kajian ini disokong dengan kajian yang dilaporkan oleh Ima-Nirwana et al. (2018) menyatakan γ - dan δ -tokotrienol meningkatkan struktur trabekular dan kekuatan mekanikal tulang perancah. Namun dalam kajian ini tiada peningkatan ketara yang dapat dilihat bagi rawatan kumpulan γ -tokotrienol berbanding δ -tokotrienol.

Oleh kerana ini adalah kali pertama kesan tokotrienol dikultur pada perancah tulang, maka perbandingan dilakukan dengan kajian *in vivo* yang telah dibuat sebelum ini. Perbandingan yang dibuat pada semua kumpulan isomer vitamin E mendapati bahawa rawatan γ -tokotrienol lebih menunjukkan penonjolan dari segi pengurangan keporosan serta peningkatan isipadu trabekular dan bilangan trabekular. Kajian ini disokong lagi dengan ilustrasi geomatrik 3D perancah melalui imej tomografi (Mikrofotograf 4.6). Kajian ini selari dengan dapatan yang diperolehi daripada kajian Wong et al. (2018) yang menyimpulkan bahawa annatto tokotrienol telah membantu meningkatkan mikrostruktur tulang pada tikus yang diaruh dengan sindrom metabolik

dan osteoporosis. Kajian sebelum ini yang dibuat oleh Deng et al. (2014) melaporkan bahawa keputusan tomografi menunjukkan γ -tokotrienol memperbaiki mikrostruktur tulang pada tikus. Walaubagaimanapun, tiada perubahan signifikan pada parameter jarak pemisahan trabekular pada mana-mana kumpulan kajian.

Walaupun, terdapat kekurangan data kajian menggunakan tomografi berkomputer mengenai kesan isomer vitamin E pada perancah. Namun begitu, hasil penemuan ini adalah penting kerana hasil kajian histomorfometri menunjukkan γ -tokotrienol memberi perlindungan yang baik pada tulang.

5.7 KESAN RAWATAN VITAMIN E DALAM MEMBANTU PEMBENTUKAN SEMULA TULANG.

Berdasarkan kajian ini, kami mendapati bahawa perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E secara individu menunjukkan kesan anabolik yang baik terhadap tulang berbanding kumpulan kawalan negatif serta kumpulan osteoporotik. Hasil pemerhatian melalui mikroskop elektron mendapati kumpulan γ - dan δ -tokotrienol mempunyai timbunan sel osteoblas yang lebih banyak yang melekat pada permukaan perancah. Keputusan ini selari dengan keputusan pewarna hematoxilin dan pewarnaan von kossa dalam kajian ini. Kumpulan perancah yang di rawat dengan γ - dan δ -tokotrienol menunjukkan tompokan sel osteoblas yang lebih banyak dan saiz trabekular yang lebih tebal berbanding isomer vitamin E yang lain. Tokotrienol mempunyai kesan antioksidan yang lebih baik berbanding tokoferol. Kumpulan isomer tokotrienol dapat menembusi tisu lapisan lemak tepu dengan melekat pada bahagian dalam membran sel dan melakukan aktiviti antioksidannya.

Kajian lepas menunjukkan bahawa tokotrienol menggalakkan sel penghasilan osteoblas dan merencatkan pembezaan sel osteoklas. Kajian dibuat oleh Ha et al. (2011) menggunakan rawatan α -tokotrienol dan α -tokoferol secara *in vitro* dibuat untuk menyiasat kesan α -tokotrienol terhadap pembezaan dan pengaktifan sel osteoklas. Kajian beliau mendapati rawatan α -tokotrienol menghalang ekspresi RANKL pada sel osteoblas dan menghalang tindakan prekursor sel osteoklas bagi mengurangkan aktiviti penyerapan sel osteoklas matang. Dalam kajian yang lain didapati γ -tokotrienol lebih selamat dan kurang toksik ke atas sel CD14+ dibandingkan dengan δ -tokotrienol (Brooks et al. 2011).

Hasil daripada ujian histomorfometri mendapati γ -tokotrienol dan δ -tokotrienol telah mengembalikan isipadu tulang serta meningkatkan ketebalan trabekular perancah tulang lembu. Penemuan daripada kajian ini menunjukkan bahawa γ - dan δ -tokotrienol membantu memelihara mikro struktur tulang dan pada masa mendorong kepada aktiviti pembezaan sel. Hasil ini kajian ini selari dengan kajian dibuat oleh Hermizi et al. (2009) yang melaporkan bahawa γ -tokotrienol berkesan dalam memelihara struktur tulang trabekular pada tikus osteoporosis diaruhkan dengan nikotin. Tambahan lagi kajian yang dibuat oleh Deng et al. (2014) menunjukkan bahawa rawatan γ -tokotrienol (100 mg/kg berat badan) pada tikus yang telah diovariectomi telah meningkatkan mikrostruktur, kepadatan mineral dan histomorfometri tulang. Dalam kajian tersebut kumpulan penyelidikan telah menyimpulkan bahawa γ -tokotrienol memberi kesan perlindungan tulang melalui perantara dalam tapak jalan mevalonat dengan menghalang aktiviti reduktase HMG-CoA. Malahan kajian lepas yang dibuat juga menunjukkan γ - dan δ -tokotrienol meningkatkan struktur trabekular dan kekuatan biomekanikal perancah tulang lembu (Ima-Nirwana et al 2018). Suplementasi γ -tokotrienol meningkatkan semua indeks struktur tulang, dinamik, selular dan kekuatan biomekanikal sementara α -tokoferol dan δ -tokotrienol hanya meningkatkan sebilangan indeks dan menunjukkan kesan anabolik tulang yang lebih baik daripada γ -tokotrienol berbanding isomer vitamin E yang lain (Shuid et al. 2010; Mehat et al. 2010).

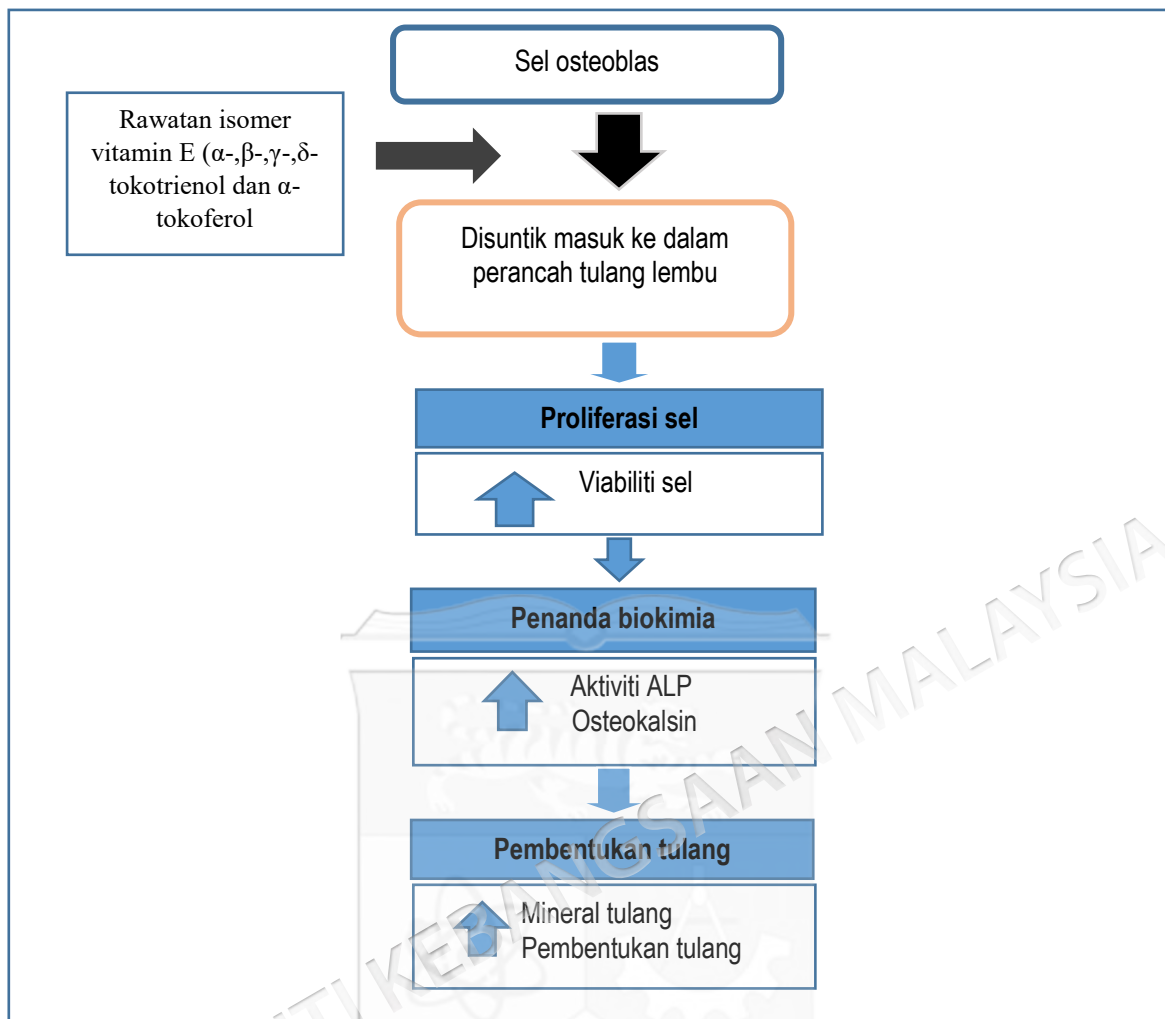
Dalam mengatur strategi bagi merawat osteoporosis, pengkaji perlu memastikan rawatan yang sesuai perlulah merangsang kadar pembentukan tulang yang optimum dan mengurangkan resopsi tulang (Brooks et al. 2011). Hasil kajian penanda biokimia dalam kajian ini menunjukkan γ - dan δ -tokotrienol telah membantu mempercepatkan penghasilan aktiviti ALP dan meningkatkan aras osteokalsin. Peningkatan aktiviti ALP dan osteokalsin menandakan berlakunya peningkatan aktiviti sel osteoblas. Hasil kajian *in vivo* oleh Chin et al. (2014) mendapati rawatan annatto tokotrienol meningkatkan ekspresi gen bagi ALP, beta –catenin, Kolagen Jenis 1 dan osteopontin (Chin et al. 2014).

Tokotrienol merupakan terbitan daripada minyak sawit mempunyai kesan antioksidan yang tinggi serta menunjukkan kesan anti-osteoporosis. Ikatan ganda dua pada rantai karbon tokotrienol membezakannya daripada tokoferol. Isomer-isomer pula dibezakan berdasarkan kumpulan metil pada cincin kromanol. Justeru itu, kedudukan

rantai sisi serta kedudukan ikatan tokotrienol ini mungkin menyumbang kepada perbezaan kesan anabolik dan kesan antiosteoporotik pada isomer vitamin E. Kehadiran tokotrienol dengan dwikarbon membantu isomer vitamin E ini menembusi lapisan lipid menghasilkan kesan antioksidan yang lebih baik dibandingkan dengan tokoferol (Sen et al. 2006). Ciri-ciri ini menyebabkan tokotrienol lebih menonjol dari segi penjagaan kualiti tulang. Rawatan α -tokoferol menunjukkan kesan yang sama atau lebih rendah dalam melindungi tulang.

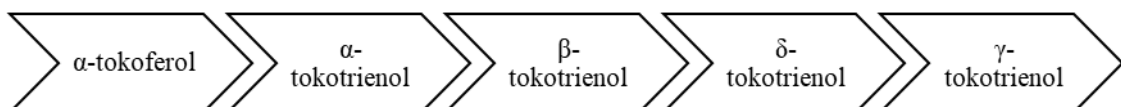
Hasil kajian haiwan terdahulu menunjukkan α -tokoferol meningkatkan struktur tulang, indeks histomorfometri dinamik dan struktur namun tidak menunjukkan kesan yang ketara berbanding rawatan tokotrienol (Muhammad et al. 2012; Norazlina et al. 2000; Shuid et al. 2008). Hasil laporan kajian juga menunjukkan α -tokoferol tidak memberi kesan ketara terhadap pembentukan tulang (Nazrun et al 2005). Hasil kajian Kamat et al. (1997) telah mengenalpasti bahawa γ -tokotrienol adalah isomer yang mempunyai kesan antioksidan yang tertinggi berbanding δ - dan α -tokotrienol. Kajian *in vitro* yang dibuat oleh Nizar et al. (2011) menunjukkan γ -tokotrienol mencegah kejadian apoptosis oleh sel osteoblas yang diaruhkan dengan hidrogen peroksida. Sehingga kini, kajian tulang secara *in vitro* bagi kesan isomer vitamin E secara individu masih lagi terhad.

Hasil dalam kajian ini, pihak pengkaji mendapati perancah tulang lembu yang dirawat dengan isomer vitamin E menunjukkan kesan yang ketara dalam pembentukan tulang berbanding kumpulan kawalan negatif dan tulang osteoporotik. Keupayaan sel osteoblas melekat baik pada permukaan perancah menunjukkan bahawa sel osteoblas boleh berkembang dengan baik dengan perancah tulang lembu. Selain itu rawatan isomer vitamin E telah meningkatkan penghasilan aktiviti ALP dan meningkatkan aras osteokalsin dalam membantu meningkatkan aktiviti osteoblas (Rajah 5.1). Rawatan isomer vitamin E juga telah membantu dalam pembentukan tulang di mana telah mengembalikan isipadu tulang dan meningkatkan trabekular perancah tulang lembu. Rawatan isomer vitamin E membantu memelihara mikrostruktur perancah tulang lembu. (Rajah 5.1).



Rajah 5.1 Ringkasan kesan rawatan isomer vitamin E pada perancah tulang lembu

Hasil kajian juga mendapati bahawa γ -tokotrienol merupakan isomer vitamin E yang terbaik dan berkesan dalam membantu pembentukan tulang diikuti rapat oleh δ -tokotrienol. Keberkesanan isomer-isomer lain adalah seperti turutan berikut: β -tokotrienol, α -tokotrienol dan akhir sekali α -tokoferol (Rajah 5.2). Sehubungan itu, γ -dan δ -tokotrienol boleh dipertimbangkan untuk digunakan sebagai rawatan pada masa hadapan sebagai rawatan pencegahan osteoporosis.



Rajah 5.2 Urutan rawatan isomer vitamin E yang paling efektif

BAB VI

RUMUSAN

6.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil kajian, kesimpulan yang boleh dibuat adalah seperti berikut:

1. Kepekatan isomer vitamin E 100 nM telah berkesan dan tidak menyebabkan kesan sitotoksik kepada sel osteoblas.
2. Perancah tulang lembu daripada lembu telah berjaya diaruh membentuk tulang yang mengalami osteoporosis.
3. Kejayaan sel osteoblas untuk melekat pada perancah serta viabiliti sel membuktikan perancah tulang lembu sesuai dijadikan sebagai perancah untuk kajian proliferasi sel.
4. Isomer γ - dan δ -tokotrienol adalah isomer vitamin E yang paling berkesan mendorong ke arah pembezaan sel osteoblas dan pembentukan tulang seperti yang dapat dibuktikan melalui peningkatan aktiviti ALP dan tahap osteokalsin yang lebih tinggi berbanding isomer vitamin E yang lain
5. Rawatan dengan γ -tokotrienol dan δ -tokotrienol telah meningkatkan pembentukan tulang dan pemineralan tulang dengan lebih baik berbanding isomer vitamin E yang lain.

6. γ -tokotrienol dan δ -tokotrienol menunjukkan kesan anabolik paling baik pada tulang diikuti dengan β -tokotrienol, α -tokotrienol dan akhir sekali α -tokoferol.
7. Daripada hasil kajian ini, dapat juga disimpulkan bahawa sistem pengkulturan *in vitro* 3-D menggunakan sel osteoblas fetus manusia pada perancah tulang lembu berkesan untuk menguji keberkesanan produk semulajadi ke atas aktiviti anabolik tulang.

Secara keseluruhannya, berdasarkan hasil kajian *in vitro* yang diperolehi ini, γ -tokotrienol dan δ -tokotrienol menunjukkan kesan anabolik paling baik terhadap tulang berbanding isomer vitamin E lain yang dikaji. Tulang yang disuntik dengan isomer γ - dan δ -tokotrienol berpotensi untuk diaplikasikan dalam bidang ortopedik untuk merangsang pembentukan tulang. Selain itu, γ - dan δ -tokotrienol berpotensi untuk dikembangkan sebagai rawatan penyakit osteoporosis.

6.2 LIMITASI KAJIAN

Terdapat beberapa limitasi yang perlu dinyatakan. Dalam kajian ini, pihak pengkaji menjalankan kajian 3D secara statik. Terdapat beberapa kelemahan daripada kaedah ini yang menyebabkan taburan sel yang tidak sekata di ruangan perancah menyebabkan penghasilan mineral tulang yang tidak seragam. Selain itu pengedaran nutrien juga tidak sekata. Ketiadaan bioreaktor untuk perfusi dan edaran nutrien ke keseluruhan perancah menjadi kekangan dalam kajian ini. Selain itu, pihak pengkaji juga tidak dapat mengawal pencemaran atau kontaminasi yang berlaku sewaktu pengkulturan. Oleh itu, masa pengkulturan terpaksa dihadkan dalam tempoh 21 hari sahaja.

6.3 CADANGAN

1. Pihak pengkaji mencadangkan agar penggunaan bioreaktor digunakan untuk kajian seterusnya. Hal ini kerana penggunaan bioreaktor dapat membantu migrasi sel ke keseluruhan perancah tulang lembu dan memastikan peredaran nutrien dapat dibuat secara sekata di kesemua bahagian perancah secara keseluruhannya.

2. Pada masa akan datang, penyelidikan yang lebih mendalam perlu dibuat bagi mengenalpasti tindakan molekular isomer vitamin E bagi menjelaskan tindakan anabolik isomer vitamin E.
3. Kajian lanjut boleh dibuat dengan memanjangkan tempoh kajian sehingga 35 hari. Pemanjangan tempoh kajian dapat memberi gambaran yang lebih jelas kesan keseluruhan isomer vitamin E terhadap proses pembentukan tulang yang melibatkan fasa pembezaan dan pemineralan tulang.
4. Kajian lanjut juga boleh dibuat dengan menguji kekuatan mekanikal perancah tulang lembu. Pengujian kekuatan mekanikal tulang dapat membantu dalam penghasilan tulang perancah yang lebih kuat dan berdaya tahan.
5. Kajian kesan isomer vitamin E terhadap sel osteoblas yang dikultur bersama sel osteoklas (*coculture*) perlu dijalankan untuk melihat kesan isomer vitamin E ke atas proses pemodelan tulang secara menyeluruh.

RUJUKAN

- Abd Manan, N., Mohamed, I.N., A.N. Shuid. 2012. Effects of low-dose versus high-dose γ -tocotrienol on the bone cells exposed to the hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Abdel-Naim A. B., Alghamdi A. A., Algandaby M. M., Al-Abbasi F. A., Al-Abd A. M., Eid B. G., et al. (2018). Rutin isolated from *Chrozophora tinctoria* enhances bone cell proliferation and ossification markers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Abukhadir, S.S.A., et al., 2012. Effects of palm vitamin E on bone-formation-related gene expression in nicotine-treated rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G., Dequeker, J. 1998. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for *in vivo* bone research. *Endocrinology* 139: 63.
- Aggarwal, B.B., Chitra Sundaram, Seema Prasad & Ramaswamy Kannappan. 2010. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: It's potential against cancer and other chronic diseases. *Biochemical Pharmacology* 80(11): 1613-1631.
- Ahmad, N.S, Khalid B.A.K., Luke, D. A & Ima-Nirwana, S. 2005. Tocotrienol offers better protection than tocopherol from free radical-induced damage of rat bone. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32(9): 761–770.
- Ahn, K.H., Jung, H.K, Jung, S.E. et al. 2011. Microarray analysis of gene expression during differentiation of human mesenchymal stem cells treated with vitamin E *in vitro* into osteoblasts. *Korean Journal of Bone Metabolism* 18(1):23–32.
- Allen, M. R., & Burr, D. B. 2014. Bone Modeling and Remodeling. *Basic and Applied Bone Biology* 75–90.
- Amini, A.R., Laurencin, C.T., Nukavarapu, S.P. 2012. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 40:363–408.
- Atia, A. & Abdullah, A. 2013. Tocotrienols: Molecular aspects beyond its antioxidant activity. *Journal of Medical Research and Practice* 2(9): 246-250.
- Augustine, M. & Horwitz, M.J. 2013. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein analogs as therapies for osteoporosis. *Current osteoporosis reports* 11(4): 400-406.
- B. J. Smith, E. A. Lucas, R. T. Turner et al. 2005. Vitamin E provides protection for bone in mature hindlimb unloaded male rats. *Calcified Tissue International* 76(4): 272–279.

- Babaie, E. & Bhaduri, S. B. 2017. Fabrication aspects of porous biomaterials in orthopedic applications: a review. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 4(1): 1–39.
- Baj A, Cedrowski J, Olchowik-Grabarek E, Ratkiewicz A, Witkowski S. 2019. Synthesis, DFT Calculations, and in Vitro Antioxidant Study on Novel Carba-Analogs of Vitamin E. *Antioxidants*. 8(12):589.
- Barrère, F., Van Blitterswijk C.A, De Groot K. 2006. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International Journal Nanomedicine* 1 (3):317-32.
- Bartl, R. & Bartl, C. 2017. Structure and architecture of bone. In: Bone Disorder: Biology, Diagnosis, Prevention, Therapy.
- Benam, K. H., Dauth, S., Hassell, B., Herland, A., Jain, A., Jang, K.-J., Ingber, D. E. 2015. Engineered in Vitro Disease Models. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 10(1): 195–262.
- Benedetti, M.G., Furlini, G., Zati, A., Letizia, Mauro, G. 2018. The Effectiveness of Physical Exercise on Bone Density in Osteoporotic Patients. *Biomed Research International*. 4840531.
- Bersini, M. Gilardi, Arrigoni, C., Talò, G., Zama, M., Zagra, L., Caiolfa, V., Moretti, M. 2016. Human in vitro 3D co-culture model to engineer vascularized bone-mimicking tissues combining computational tools and statistical experimental approach. *Biomaterials* 76: 157–172.
- Binosto (alendronate sodium) prescribing information. San Antonio, Texas: *Mission Pharmacal Co*; 2015.
- Bonucci, E. & Ballanti, P. 2013. Osteoporosis–bone remodeling animal models. *Toxicologi Pathology* 42:957–969.
- Borciani, G., Montalbano, G., Baldini, N., Cerqueni, G., Vitale-Brovarone, C., & Ciapetti, G. 2020. Co-Culture Systems of Osteoblasts and Osteoclasts: Simulating in Vitro Bone Remodeling in Regenerative Approaches. *Acta Biomaterialia*.
- Bose, S., Vahabzadeh, S., Bandyopadhyay, A. 2013. Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today* 16:496–504.
- Bouxsein, M.L. 2003. Bone quality: where do we go from here? *Osteoporosis International*. 14(5): S118–2.
- Boyan, B., Hummert, T. W., Dean, D., Schwartz, Z. 1996. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17(2): 37–146.
- Bracey, D., Seyler, T., Jinnah, A., Lively, M., Willey, J., Smith, T., Whitlock, P. 2018. A Decellularized Porcine Xenograft-Derived Bone Scaffold for Clinical Use as a

Bone Graft Substitute: A Critical Evaluation of Processing and Structure. *Journal of Functional Biomaterials* 9(3): 45.

- Brooks R., Kalia P., Ireland D.C., Beeton C., Rushton N. 2011. Direct Inhibition of Osteoclast Formation and Activity by The Vitamin E Isomer γ -tocotrienol. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 81(6):358–367.
- Budin, S.B., Othman, F., Loius, 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.
- Caraglia, M., Addeo, R., Costanzo, R., Montella, L., Faiola, V., Marra, M., Abbruzzese, A., Palmieri, G., Budillon, A., Grillone, F., Venuta, S., Tagliaferri, P., Del Prete, S. 2005. Phase II study of temozolomide plus pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of brain metastases from solid tumours. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 57(1):34-9.
- Cheung, C.L., Ang, S.B., Chadha, M., Chow, E.S., Chung, Y.S., Hew, F.L., Jaisamrarn, U., Ng, H., Takeuchi, Y., Wu, C.H., Xia, W., Yu, J., Fujiwara, S. 2018. An Updated Hip Fracture Projection in Asia: The Asian Federation of Osteoporosis Societies study. *Osteoporosis Sarcopenia* 4(1):16-21.
- Chin K.Y. & Ima-Nirwana, S. 2014. Effects of annatto-derived tocotrienol supplementation in osteoporosis induced by testosterone deficiency in rats. *Clinical Intervention Aging*. 9:1247–1259.
- Chin, K.Y.; Abdul-Majeed, S.; Fozi, N.F.; Ima-Nirwana, S. 2014. Annatto tocotrienol improves indices of bone static histomorphometry in osteoporosis due to testosterone deficiency in rats. *Nutrients*.
- Chin K.Y., Abdul-Majeed S., Mohamed N., Ima-Nirwana S. 2017. The effects of tocotrienol and lovastatin co-supplementation on bone dynamic histomorphometry and bone morphogenetic protein-2 expression in rats with estrogen deficiency. *Nutrients* 9:143.
- Chung, H.J., Kim, W.K., Oh, J., Kim, M.R., Shin, J.S, Lee, J., Ha, I.H., Lee, S.K. 2017. Anti-Osteoporotic Activity of Harpagoside by Upregulation of the BMP2 and Wnt Signaling Pathways in Osteoblasts and Suppression of Differentiation in Osteoclasts. *Journal of Natural Products*. 24:0(2):434-442.
- Compadre, C. M., Singh, A., Thakkar, S., Zheng, G., Breen, P. J., Ghosh, S., Kiaei, M., Boerma, M., Varughese, K. I., & Hauer-Jensen, M. 2014. Molecular dynamics guided design of tocoflexol: a new radioprotectant tocotrienol with enhanced bioavailability. *Drug Development Research* 75(1), 10–22.
- Cosman, F., de Beur, S. J., LeBoff, M. S., Lewiecki, E. M., Tanner, B., Randall, S., & Lindsay, R. 2014. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporosis International*. 25(10): 2359–2381.

- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., and Yamada, K.M. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294: 1708.
- Damodaran, P., Subramaniam, R., Omar, S.Z., Nadkarni, P., Paramsothy, M. 2000. Profile of a menopause clinic in an urban population in Malaysia. *Singapore Medical Journal* 41: 431–435.
- Das, S. & Crockett, J. 2013. Osteoporosis—a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Design Development and Therapy*. 7:435–448.
- De Witte, T.M., Lidy, E. F.A., Amir, A.Z., Nicholas A. P.2018. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regenerative Biomaterials* 5(4): 197–211.
- Delaisse J. M. 2014. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey reports*, 3, 561.
- Deng, L., et al. 2014. γ -Tocotrienol protects against ovariectomy-induced bone loss via mevalonate pathway as HMG-CoA reductase inhibitor. *Bone* 67: 200-207.
- Edmondson, R., et al. 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies* 12(4): 207-218.
- Elsdale, T. & Bard, J. 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *Journal of Cell Biology*. 54(3):626-37.
- Feldstein, A., Elmer, P.J., Orwoll, E., Herson, M., Hillier, T. 2003. Bone mineral density measurement and treatment for osteoporosis in older individuals with fractures: a gap in evidence-based practice guideline implementation. *Archives of Internal Medicine* 163(18):2165-72.
- Filleul, O., Crompton, E., & Saussez, S. 2010. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 136(8): 1117–1124.
- Gallagher, J.C. & Sai, A.J. 2010. Vitamin D insufficiency, deficiency, and bone health. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 95(6):2630-3.
- Glowacki, J., Rey, C., Glimcher, M. J., Cox, K. A., & Lian, J. 1991. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 45(3): 292–302.
- Grady, D., Ettinger, B., Moscarelli, E., et al. 2004. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation Investigators. Safety and adverse effects associated with raloxifene: multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Obstetrics Gynecology* 104: 837–844.
- Guadalupe-Grau, A., Fuentes, T., Guerra, B., Calbet, J.A.S.2009. Exercise and bone mass in adults. *Ports Med* 39(6): 439-68.

- Gutiérrez-Prieto, S. J., Perdomo-Lara, S. J., Diaz-Peraza, J. M., & Sequeda-Castañeda, L. G. 2011). Analysis of in Vitro Osteoblast Culture on Scaffolds for Future Bone Regeneration Purposes in Dentistry. *Advances in Pharmacological Sciences* 1–9.
- Ha, H, Lee J.H., Kim, H.N., Lee, Z.H. 2011. α -Tocotrienol inhibits osteoclastic bone resorption by suppressing RANKL expression and signaling and bone resorbing activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 406(4):546-51.
- Hapidin, H., Rozelan, D., Abdullah, H., Wan Hanaffi, W. N., & Soelaiman, I. N. 2015. Quercus infectoria Gall Extract Enhanced the Proliferation and Activity of Human Fetal Osteoblast Cell Line (hFOB 1.19). *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS* 22(1), 12–22.
- Hauser, M., Siegrist, M., Keller, I., & Hofstetter, W. 2018. Healing of fractures in osteoporotic bones in mice treated with bisphosphonates – A transcriptome analysis. *Bone* 112: 107–119.
- Heinemann, C., Heinemann, S., Wenisch, V., Alt, H., Worch, T. 2013. Calcium phosphate phases integrated in silica/collagen nanocomposite xerogels enhance the bioactivity and ultimately manipulate the osteoblast/osteoclast ratio in a human coculture model. *Acta Biomaterials* 9: 4878–4888.
- Hermizi, H., Faizah, O, Ima-Nirwana, S, Ahmad Nazrun, S., Norazlina., M. 2009. Beneficial effects of tocotrienol and tocopherol on bone histomorphometric parameters in sprague-dawley male rats after nicotine cessation. *Calcified Tissue International*. 84(1).
- Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E.V., Jönsson, B., Kanis, J.A. 2013. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives Osteoporosis* 8(1-2):136.
- Hofmann, M. & Garcia-Fuentes. 2011. Bioactive scaffolds for the controlled formation of complex skeletal tissues, in: Daniel Eberli (Ed.), *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials, InTech* 393–432.
- Ima-Nirwana, S., Chin, K.Y., Elvy Suhana, M.R. 2018. Effects of Individual Tocotrienol Isomers on Bone Cells in A 3D Cell Culture System. *Journal of Oil Palm, Environment & Health* 9:57-63.
- Ima-Nirwana, S., Kiftiah, A. Zainal, A.G., Norazlina, M., Gapor, M.T., Khalid, B.A.K. 2000. Palm vitamin E prevents osteoporosis in orchidectomized growing male rats. *Natural Product Sciences* 6(4): 155–160.
- Inokuchi H, Hirokane H, Tsuzuki T, Nakagawa K, Igarashi M, Miyazawa T. 2003. Anti-angiogenic activity of tocotrienol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67(7):1623-7.

- Ishii, I., Tomizawa, A., Kawachi, H., Suzuki, T., Kotani, A., Koshushi, I., Itoh, H., Morisaki, N., Bujo, H., Saito, Y., Ohmori, S., and Kitada, M. 2001. Histological and functional analysis of vascular smooth muscle cells in a novel culture system with honeycomb-like structure. *Atherosclerosis* 158: 377.
- Jayusman, P.A., Budin, S.B., Ghazali, A.R. & Taib, I.S. 2017. The effect of tocotrienol-rich fraction on oxidative liver damage induced by fenitrothion. *Sains Malaysiana* 46(9): 1603-1609.
- Jeon, J.S., Bersini, S., Gilardi, M., Dubini, G., Charest, J.L., Moretti, M., Kamm, R.D. 2015. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proceeding of the National Academy Science*. 112: 214–219.
- Jilka, R. L. 2009. Inhibiting the Inhibitor: A New Route to Bone Anabolism. *Journal of Bone and Mineral Research* 24(4): 575–577.
- Kamat JP, Sarma HD, Devasagayam TP, Nesaretnam K, Basiron Y.1997. Tocotrienols from palm oil as effective inhibitors of protein oxidation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Molecular and Cell Biochemistry* 170(1–2):131–137.
- Karim, N.A., Aman, N., Ghani, S.M.A., Lim, J.J., Dahrizal, D.S. & Wan Ngah, W.Z. 2015. Tocotrienol rich fraction supplementation increased the antioxidant enzymes activities in skeletal and heart muscle of aging mice. *International Journal of Biomedicine and Advance Research*. 6(12): 824-830.
- Kay Sinclair & Burg, K.J.L. 2011. Effect of osteoclast co-culture on the differentiation of human mesenchymal stem cells grown on bone graft granules. *Journal of Biomaterial Science Polymer*. 22: 789–808.
- Kenkre, J., & Bassett, J. 2018. The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 55(3): 308–327.
- Kiebzak GM, Beinart GA, Perser K, Ambrose CG, Siff SJ, Heggeness MH. 2002. Undertreatment of osteoporosis in men with hip fracture. *Archives Internal Medicine*. 162(19):2217.
- Kim, J.M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M.B., Shim, J.H. 2020. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 9(9): 2073.
- Kneser, U., Stangenberg, L., Ohnolz, J., Buettner, O., Stern-Straeter, J., Möbest, D., Horch, R.E., Stark, G.B. and Schaefer, D.J. 2006. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 10(3): 695-707.
- Kouroupis, D., Baboolal, T. G., Jones, E., & Giannoudis, P. V. 2013. Native multipotential stromal cell colonization and graft expander potential of a bovine natural bone scaffold. *Journal of Orthopaedic Research*. 31(12).

- Kuo, T.R., Chen, C.H. 2017. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomarker Research* 5(1):18.
- Langsetmo et al. 2012. Physical activity, body mass index and bone mineral density-associations in a prospective population-based cohort of women and men: The Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). *Bone* 50(1):401-8.
- Lee J.-K., Khir A.S.M. 2007. The incidence of hip fracture in Malaysians above 50 years of age: Variation in different ethnic groups. *APLAR Journal of Rheumatology*. 10:300–305.
- LeGeros, R. Z. & LeGeros, J. P. 1995. *Calcium phosphate biomaterials: preparation, properties, and biodegradation. Encyclopedia Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part A: Materials*. vol. 2. New York, USA. Marcel Dekker.
- Leong, K. F., Cheah, C. M. & Chua, C. K. 2003. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* 24(13): 2363–2378.
- Li, Q., Zhou, G., Yu, X., Wang, T., Xi, Y., & Tang, Z. 2015. Porous deproteinized bovine bone scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using chitosan microspheres. *Biomedical engineering online* 14 :33.
- Linden, V.D., Waarsing, J. C. & Weinans, H. 2006. The use of micro-CT to study bone architecture dynamics noninvasively. *Drug Discovery Today Technology*. 3: 213–219.
- Lindsay, R., Krege, J. H., Marin, F., Jin, L., & Stepan, J. J. 2016. Teriparatide for osteoporosis: importance of the full course. *Osteoporosis International: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the US*. *Osteoporosis international* 27(8): 2395–2410.
- Liu, Y., Lim, J., Teoh, S-H. 2013. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology Advances* 31: 688–705.
- Lobo, R.A. 2017. Hormone-replacement therapy: current thinking. *Nature Reviews Endocrinology*. 13(4): 220-231.
- Loh, Q.L. & Choong, C. 2013. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B Reviews*. 9:485–502.
- Looker, A.C., Borrud, L.G., Dawson-Hughes, B., Shepherd, J, A, Wright, N.C. 2012. Osteoporosis or low bone mass at the femur neck or lumbar spine in older adults: United States, 2005-2008. *NCHS Data Brief* 93:1-8.
- Maeda, S.S., Lazaretti-Castro, M. 2014. An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 58(2):162-71.

- Mangialasche, F., Xu, W., Kivipelto, M., Costanzi, E., Ercolani, S., Pigliautile, M., Mecocci, P. 2012. Tocopherols and tocotrienols plasma levels are associated with cognitive impairment. *Neurobiology of Aging* 33(10): 2282–2290.
- Manolagas et al. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 21: 115-137.
- Manson, J.E, Chlebowski, R.T., Stefanick, M.L, et al. 2013. Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials. *JAMA* 310(13):1353-1368.
- Martin, H.M & Bartholomew, E.F. 2017. *Essentials of Anatomy & Physiology*, 8th Edition. Pearson.
- Martin, T.J. & Sims, N.A. 2005. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends in Molecular Medicine*. 11: 76–8.
- Martínez, M., Medina, S., del Campo, M. et al. 1998. Effect of Polyethylene on Osteocalcin, Alkaline Phosphatase and Procollagen Secretion by Human Osteoblastic Cells. *Calcified Tissue International*. 62: 453–456.
- Mazlan, M., Sue Mian, T., Mat Top, G. & Zurinah Wan Ngah, W. 2006. Comparative effects of α -tocopherol and γ -tocotrienol against hydrogen peroxide induced apoptosis on primary cultured astrocytes. *J. Neurol. Science* 243: 5-12.
- McGonigle, P., & Ruggeri, B. 2014. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. *Biochemical Pharmacology* 87(1): 162–171.
- Mehat M, Shuid A, Mohamed N, Muhammad N, Soelaiman I (2010) Beneficial effects of vitamin E isomer supplementation on static and dynamic bone histomorphometry parameters in normal male rats. *Journal of Bone Mineral Metabolism*. 28(5):503–509.
- Mehranjani, M.S.& Azimi, A. 2014. In Vitro study of the effect of Vitamin E on viability, morphological changes and induction of osteogenic differentiation in adult rat bone marrow mesenchymal stem cells.
- Meunier, P. J., Roux, C., Seeman, E., Ortolani, S., Badurski, J. E., Spector, T. D., Reginster, J.-Y. 2004. The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis. *New England Journal of Medicine* 350(5): 459–468.
- Mikos, A. G., Sarakinos, G., Lyman, M. D., Ingber, D. E., Vacanti, J. P., Langer, R. 1993. Prevascularization of porous biodegradable polymers. *Biotechnology and Bioengineering* 42(6): 716–723.
- Miller, P. D., Chines, A. A., Christiansen, C., Hoeck, H. C., Kendler, D. L., Lewiecki, E. M., Delmas, P. D. 2007. Effects of Bazedoxifene on BMD and Bone Turnover in Postmenopausal Women: 2-Yr Results of a Randomized, Double-Blind,

- Placebo-, and Active-Controlled Study. *Journal of Bone and Mineral Research* 23(4): 525–535.
- Miyazawa, T., Shibata, A., Nakagawa, K. and Tsuzuki, T. 2008. Anti-angiogenic function of tocotrienol. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 17 (1): 253–256.
- Mizushima, Y., Nakagawa, K., Shibata, A., Awata, Y., Kuriyama, I., Shimazaki, N., Koiwai, O., Uchiyama, Y., Sakaguchi, K., Miyazawa, T., et al. 2006. Inhibitory effect of tocotrienol on eukaryotic DNA polymerase λ and angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 339: 949–955.
- Morseth B., Emaus N., Jørgensen L. 2011. Physical activity and bone: The importance of the various mechanical stimuli for bone mineral density. A review. *Norsk epidemiologi*. 20(2):173–178.
- Muhammad, N., et al. 2012. Two different isomers of vitamin e prevent bone loss in postmenopausal osteoporosis rat model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Nadia, R. 2008. Molecular biology of bone remodeling. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 5(1): 49–56.
- Nazarali, S. A., & Narod, S. A. 2014. Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. *Breast cancer* (Dove Medical Press). 6: 29–36.
- Nazrun, A., et al., 2008. Effects of palm tocotrienols on oxidative stress and bone strength in ovariectomised rats. *Medicine & Health* 3 (2): 247–255.
- Nesaretnam, K., Guthrie, N., Chambers, A.F. & Carroll, K.K. 1995. Effects of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Lipids* 30: 1139–1143.
- Niedźwiedzki, T. & Filipowska, J. 2015. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *Journal of Molecular Endocrinology*. 55: R23–R36.
- Nizar, A.M., Nazrun, A.S., Norazlina, M., Norliza, M., Ima Nirwana, S. 2011 Low dose of tocotrienols protects osteoblasts against oxidative stress. *Clinical Therapeutics*. 162(6):533–538.
- Norazlina, M., Lee, P. L., Lukman, H. I., Nazrun, A. S., Ima-Nirwana, S. 2007 Effects of vitamin E supplementation on bone metabolism in nicotine-treated rats. *Singapore Medical Journal* 48: 195–199.
- Norazlina, M., et al., 2000. Palm vitamin E is comparable to α -tocopherol in maintaining bone mineral density in ovariectomised female rats. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 108(04): 305–310.

- Nyberg, E., Holmes, C., Witham, T., et al. 2016. Growth factor-eluting technologies for bone tissue engineering. *Drug Delivery and Translational Research*. 6:184–94.
- Oftadeh, R., Perez-Viloria, M., Villa-Camacho, J.C., Vaziri, A., Nazarian, A. 2015. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review. *Journal Biomechanical Engineering*. 137(1):0108021–01080215.
- Oliveira, J. M., Silva, S. S., Malafaya, P. B., Rodrigues, M. T., Kotobuki, N., Hirose, M., Reis, R. L. 2009. Macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications: Physicochemical characterization and assessment of rat bone marrow stromal cell viability. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 91A (1): 175–186.
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G., Stelzer, E.H. 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8(10):839-45.
- Pepa, G. D., & Brandi, M. L. 2016. Microelements for bone boost: the last but not the least. Clinical cases in mineral and bone metabolism. *Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 13(3) : 181–185.
- Pouresmaeili, F., Kamalidehghan, B., Kamarehei, M., Goh, Y.M. 2018. A comprehensive overview on osteoporosis and its risk factors. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 14:2029-2049.
- Qaseem, A., Forciea, M.A., McLean, R.M., Denberg, T.D. 2017. Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. *Annal of Internal Medicine*. 166(11): 818-839.
- Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R., & Wenstrup, R. J. 2009. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research* 7(6): 683–692.
- Qureshi, A.A., Qureshi, N., Wright, J., Shen, Z., Kramer, G., Gapor, A., Chong, Y.H., DeWitt, G., Ong, A., Peterson, D.M. 1991. Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee). *American Journal of Clinical Nutrition*. 53: 1021S–1026S.
- Rao, R.R., Ceccarelli, J., Vigen, M.L., Gudur, M., Singh, R., Deng, C.X., Putnam, A.J., Stegemann, J.P. 2014. Effects of hydroxyapatite on endothelial network formation in collagen/fibrin composite hydrogels in vitro and in vivo. *Acta Biomaterial*. 10: 3091–3097.
- Rashmi, P.R., Amarpal, Aithal, H. P., Kinjavdekar, P., Pawde, A. M., Tiwari, A. K., Sangeetha, P., Tamilmahan, P., & Manzoor, A. B. 2017. Evaluation of tissue-engineered bone constructs using rabbit fetal osteoblasts on acellular bovine cancellous bone matrix. *Veterinary world* 10(2): 163–169.

- Reginster, J.Y., Pelousse, F. & Bruyère, O. 2013. Safety concerns with the long-term management of osteoporosis. *Expert opinion on drug safety* 12(4): 507-522.
- Rodan G. A. 1998. Bone homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(23), 13361–13362.
- Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., et al. 2017. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering* 78: 1246–1262.
- Rui, G., Jin, X., Lin, S., Haim, T. 2012. Histocompatibility of acellular matrix bone with osteoblast and vascular endothelial cells. *Bone Regeneration* 321–348.
- Russell, R.G., Watts, N.B., Ebetino, F.H., Rogers, M.J. 2008. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis International*. 19(6):733-59.
- Rustom, L. E., Boudou, T., Nemke, B. W., et al. 2016. Multiscale porosity directs bone regeneration in biphasic calcium phosphate scaffolds. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 3(11): 2768–2778.
- Rutkovskiy, A., Stensløkken, K. O., & Vaage, I. J. 2016. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research* 22: 95–106.
- Sapre, S. & Thakur, R. 2014. Lifestyle and dietary factors determine age at natural menopause. *Journal of Mid-life Health* 5:3.
- Saravana, K. & Ramasamy. 2017. Structure and Functions of Blood Vessels and Vascular Niches in Bone. *Stem Cells International*. 2017:1-10.
- Sen, C. K., Khanna, S., & Roy, S. 2006. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. *Life Science*. 78(18): 2088–2098.
- Sen, C. K., Khanna, S., Rink, C. and Roy, S. 2007. Tocotrienols: The emerging face of natural Vitamin E. *Vitamins and Hormones* 76: 203-261.
- Sen, C.K., Rink, C. & Khanna, S. 2010. Palm oil-derived natural vitamin E alpha-tocotrienol in brain health and disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 29(3): 314S-323S.
- 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 Radical Biology & Medicine*. 10:263–275.
- Shah, A.K. & Yeganehjoo, H. 2019. The stimulatory impact of d- δ -Tocotrienol on the differentiation of murine MC3T3-E1 preosteoblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 462(1-2): 173-183.
- Shahabipour, F., Mahdavi-Shahri, N., Matin, M. M., Tavassoli, A., & Zebarjad, S. M. 2013. Scaffolds derived from cancellous bovine bone support mesenchymal

- stem cells' maintenance and growth. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 49(6): 440–448.
- Shuid A., Mehat Z., Mohamed N., Muhammad N., Soelaiman I. 2010. Vitamin e exhibits bone anabolic actions in normal male rats. *Journal of Bone Mineral Metabolism*. 28: 149–156.
- Strom, O., Borgstrom, F., Kanis, J., Compston, J., Cooper, C., McCloskey, E. et al. 2011. Osteoporosis: burden, health care provision and opportunities in the EU: a report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives of Osteoporosis* 6: 59–155.
- Subramaniam M, Jalal SM, Rickard DJ, Harris SA, Bolander ME, Spelsberg TC. 2002. Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER alpha cells: bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. *Journal of Cell Biochemistry*. 87(1):9-15.
- Szulc, P., Bauer, D. C., & Eastell, R. 2013. Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. Primer on the Metabolic *Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* 297–306.
- T. Yoshikawa, T., Ohgushi, H. & Tamai, S. 1996. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* 32(3): 481–492.
- Tabatabaei-Malazy O., Larijani B., Abdollahi M. 2015. Targeting metabolic disorders by natural products. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 14:57.
- Taylor, C.L., Yaktine, A.L, Del Valle, H.B., et al. 2011. *Institute of Medicine committee to review dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. Washington, DC. National Academies Press.
- Thu, H.E., Mohamed, I.N., Hussain, Z, Shuid, A.N. 2017. Eurycoma longifolia as a potential alternative to testosterone for the treatment of osteoporosis: Exploring time-mannered proliferative, differentiative and morphogenic modulation in osteoblasts. *Journal of Ethnopharmacology*. 4(195) :143-158.
- Tortora, G.J. & Derrickson, B. 2009. *The skeletal system: bone tissue*. In: *Principles of Anatomy and Physiology. A description of types of bones from the 1918 edition of Gray's Anatomy of the Human Body*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Valentin, D., Alain, G., Aline, M. Luc, M., Lafage-Proust, M.H., Alain, R., Val, M., Noble, B., Jones, D. B., Vico, L. 2008. Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Engineering. Part A* 14: 117–126.
- Vavken, P., Fleming, B. C., Mastrangelo A.N., Machan J. T., Murray, M. M. 2012. Biomechanical outcomes after bioenhanced anterior cruciate ligament repair and

anterior cruciate ligament reconstruction are equal in a porcine model. *Arthroscopy* 28(5): 672–80.

- Vogel, V. G. 2006. Effects of Tamoxifen vs Raloxifene on the Risk of Developing Invasive Breast Cancer and Other Disease Outcomes The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial. *JAMA* 295(23), 2727.
- Wan Hasan, W.N., Abd Ghafar, N., Chin, K.Y. & Ima-Nirwana, S. 2018. Annatto-derived tocotrienol stimulates osteogenic activity in preosteoblastic MC3T3-E1 cells: a temporal sequential study. *Drug Design, Development and Therapy*. 12: 1715-1726.
- Wang, B., Borazjani, A., Tahai, M., Curry A. L., Simionescu D. T., Guan J., To F., Elder, S. H., Liao, J. 2010. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94(4): 1100–1110.
- Wang, W., Olson, D., Cheng, B., Guo, X., Wang, K. 2012. Sanguis Draconis resin stimulates osteoblast alkaline phosphatase activity and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Journal Ethnopharmacology*. 6:168-74.
- Watts, N.B., et al. 2010. AACE Osteoporosis Task Force. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocrine Practice*. 16 (3):1-37.
- Weatherholt, A.M., Fuchs, R.K., & Warden S.J 2012. Spelcialised connective Tissue bone, the structural Framework of the upper extremity. *Journal of Hand Therapy* 25(2): 123-131.
- Willems, B.A., Vermeer, C., Reutelingsperger, C.P., Schurgers, L.J. 2014. The realm of vitamin K dependent proteins: shifting from coagulation toward calcification. *Molecular Nutrition & Food Research*. 58(8):1620-35.
- Wong, S.K., et al. 2018. The Effects of Vitamin E from *Elaeis guineensis* (Oil Palm) in a Rat Model of Bone Loss Due to Metabolic Syndrome. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 15(9).
- Wong, S.K., et al., 2018. The effects of palm tocotrienol on metabolic syndrome and bone loss in male rats induced by high-carbohydrate high-fat diet. *Journal of Functional Foods* 44: 246-254.
- Wong, S.K.; Chin, K.-Y.; Suhaimi, F.H.; Ahmad, F.; Ima-Nirwana, S. 2018. The effects of palm tocotrienol on metabolic syndrome and bone loss in male rats induced by high-carbohydrate high-fat diet. *Journal of Functional Foods*. 44, 246–254.
- Wong, S.K., Chin, K.Y., Fairus, A., Ima-Nirwana, S. 2020. Regulation of inflammatory response and oxidative stress by tocotrienol in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Functional Foods* 74.

- Wu, S. J., Liu, P. L. & Ng, L. T. 2008. Tocotrienol-rich fraction of palm oil exhibits anti-inflammatory property by suppressing the expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 52(8):921-929.
- Wu, S., Liu, X., Yeung, K.W.K., et al. 2014. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Material Science and Engineering R: Reports*. 80:1–36.
- Xu, W., He, P., S., Cui., Mi, Y., Yang, Li, Y. & Zhou, S. 2018. Gamma-Tocotrienol Stimulates the Proliferation, Differentiation, and Mineralization in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *Journal of Chemistry*.
- Yoshikawa, T., Ohgushi, H., and Tamai, S. 1996. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* 32(3): 481–492.
- Zhang, Y., Ni, M., Zhang, M., & Ratner, B. 2003. Calcium Phosphate—Chitosan Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering* 9(2), 337–345.
- Zimmermann, E., Schaible, E., Gludovatz, B. et al. 2016. Intrinsic mechanical behavior of femoral cortical bone in young, osteoporotic and bisphosphonate-treated individuals in low- and high energy fracture conditions. *Scientific Reports* 6:21072.

LAMPIRAN A

ARTIKEL YANG TELAH DITERBITKAN

Senarai Penerbitan	Status	Penerbit
1. Optimization of The Static Human Osteoblast/osteoclast Co-Culture System James Jam Jolly, Kok-Yong Chin, <u>Mohd Fozi Nur Farhana</u> , Ekram Alias, Kien Hui Chua, Wan Nuraini Wan Hasan and Soelaiman Ima-Nirwana	Terbit 2017	Iranian Journal of Medical Sciences Scopus
2. Comparing The Effects of Alpha-Tocopherol and Tocotrienol Isomers on Osteoblasts HFOB 1.19 Cultured on Bovine Bone Scaffold <u>Nur Farhana Mohd Fozi</u> , James Jam Jolly, Kok-Yong Chin, Chua Kien Hui, and Soelaiman Ima-Nirwana	Diterima	Sains Malaysiana Scopus Q3
3. Comparison of the skeletal effects between alpha-tocopherol and tocotrienol isomers using a static three-dimensional bone co-culture model James Jam Jolly, <u>Nur Farhana Mohd Fozi</u> , Kok-Yong Chin, Sok Kuan Wong, Chua Kien Hui, Ekram Alias, Nur Sabariah Adnan, Soelaiman Ima-Nirwana	Terbit 2021	Experimental & Therapeutic Medicine SCOPUS Q4 IF: 1.785
4. A newly designed and characterized bovine bone scaffold promote growth of human osteoblast-osteoclast co-culture cells in static 3-dimensional co-culture system James Jam Jolly, <u>Nur Farhana Mohd Fozi</u> , Chin Kok Yong, Chua Kien Hui, Ekram Alias, Ima Nirwana Soelaiman	Terbit 2018	Medicine and Health WOS. MyCite
5. The Relationship Between Circulating Testosterone and Inflammatory Cytokines in Men Mohamad, Nur-Vaizura, Sok Kuan Wong, Wan Nuraini Wan Hasan, James Jam Jolly, <u>Mohd Fozi Nur-Farhana</u> , Soelaiman Ima-Nirwana and Kok-Yong Chin	Terbit 2018	The Aging Male ISI Q2 IF : 2.500

Optimization of the Static Human Osteoblast/Osteoclast Co-culture System

James Jam Jolly¹, MSc;
Kok-Yong Chin¹, PhD;
Mohd Fozil Nur Farhana², BSc;
Ekram Alias³, PhD;
Ken Hui Chua⁴, PhD;
Wan Nuraimi Wan Hasan¹, MSc;
Soelaiman Ima-Nirwana¹, MBBS, PhD

¹Departments of Pharmacology, Faculty of Medicine, Pusat Perubatan University Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Wilayah Persekutuan Kuala Lumpur, Malaysia;

²Departments of Biochemistry, Faculty of Medicine, Pusat Perubatan University Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Wilayah Persekutuan Kuala Lumpur, Malaysia;

³Departments of Physiology, Faculty of Medicine, Pusat Perubatan University Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Wilayah Persekutuan Kuala Lumpur, Malaysia;

Correspondence:
Soelaiman Ima-Nirwana, MBBS, PhD;
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia.
Tel: +60 3 40405514
Fax: +60 3 26938205
Email: masoel@ppukm.lum.edu.my
Received: 6 May 2017
Revised: 18 July 2017
Accepted: 13 August 2017

What's Known

• Mammalian osteoblast/osteoclast co-culture systems are known. Type I collagen, alkaline phosphatase and calcium detection are well-known molecular markers for osteoblast maturity. Tartrate-resistant acid phosphatase is a well-accepted osteoclast histochemical marker.

• Exogenous macrophage colony-stimulating factor and the receptor activator of the nuclear factor- κ B ligand are required in human osteoblast/osteoclast co-culture systems.

What's New

• Suitable ratio for co-culturing peripheral blood mononuclear cells with differentiated osteoclasts was 1 osteoclast: 2 osteoblasts. Exact time for co-culturing human peripheral blood mononuclear cells with differentiated osteoclasts was determined to be day 3.

• No exogenous sources of the macrophage colony-stimulating factor and the receptor activator of the nuclear factor- κ B ligand were needed in this co-culture system.

Abstract

Osteoblasts (OBs) and osteoclasts (OCs) are 2 major groups of bone cells. Their cell-to-cell interactions are important to ensure the continuity of the bone-remodeling process. Therefore, the present study was carried out to optimize an OB/OC co-culture system utilizing the human OB cell line hFOB 1.19 and OCs extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). It was a 2-step procedure, involving the optimization of the OB culture and the co-culture of the OBs with PBMCs at an optimum ratio. Firstly, pre-OBs were cultured to 90% confluency and the time required for differentiation was determined. OB differentiation was determined using the van Gieson staining to detect the presence of collagen and Alizarin Red for calcium. Secondly, OBs and OCs were co-cultured at the ratios of 1 OC: 1 OB, 1 OC: 4 OBs, 2 OCs: 1 OB, and 1 OC: 2 OBs. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was used to detect the differentiation of the OCs. The results showed that collagen was present on day 1, whereas calcium was detected as early as day 3. Based on the result of TRAP staining, 1 OC: 2 OBs was taken as the most appropriate ratio. No macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of the nuclear factor- κ B ligand were added because they were provided by the OBs. In conclusion, these optimization processes are vital as they ensure the exact time point and ratio of the OB/OC co-culture in order to produce a reliable and reproducible co-culture system.

Please cite this article as: Jolly JJ, Chin KY, Nur Farhana MF, Alias E, Chua KH, Wan Hasan WN, Ima-Nirwana S. Optimization of the Static Human Osteoblast/Osteoclast Co-Culture System. *Van J Med Sci*. 2018;43(2):208-213.

Keywords • Bone and Bones • Coculture Techniques • Osteoblasts • Osteoclasts • Bone Remodeling

Introduction

Osteoporosis is defined as a metabolic bone disorder resulting from an imbalance between bone formation and bone resorption, in which the rate of bone resorption is higher than that of bone formation.¹ The dynamic process of bone formation and resorption, also called "bone remodeling", is governed by 2 cell types: osteoblasts (OBs) and osteoclasts (OCs).² While OBs are specialized stromal cells which play a major role in bone mineralization, formation, and deposition, OCs are multinucleated giant cells which originate from a hematopoietic lineage and are responsible for the resorption of the mineralized bone matrix.³

Human OB/OC co-culture systems have been used previously as a model to study the interactions between bone cells.³ This model is also useful for screening the potential modulators of the bone-remodeling process in the search for antiosteoporotic

Skeletal microenvironment system utilising bovine bone scaffold co-cultured with human osteoblasts and osteoclast-like cells

JAMES JAM JOLLY¹, NUR FARHANAH MOHD POZI¹, KOK-YONG CHIN^{1,2}, SOK KUAN WONG¹, KIEN HUI CHUA¹, EKRAM ALLAS³, NUR SABARAH ADNAN¹ and SOELAIMAN IMA-NIRWANA¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia, Cheras, Wilayah Persekutuan Kuala Lumpur 56000, Malaysia; ²State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Renji-Med X Clinical Stem Cell Research Center, Department of Urology, Ren Ji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201112, P.R. China; ³Department of Physiology, Faculty of Medicine, Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia, Cheras, Wilayah Persekutuan Kuala Lumpur 56000, Malaysia

Received March 13, 2020; Accepted April 6, 2021

DOI: 10.3892/etm.2021.10112

Abstract. A three-dimensional *ex vivo* bone cell culture system mimicking the skeletal system is useful for bone tissue engineering and as drug discovery platforms. The present study aimed to establish a three-dimensional skeletal culture system using native bovine bone scaffolds and human bone cells. Bovine bone scaffolds were cultured with human foetal osteoblasts 1.19 and human peripheral blood mononuclear cells for 21 days under standard culture conditions. The following groups were established: Decalcified unseeded bone scaffold (DUBS) as baseline control, decalcified seeded bone scaffold (DSBS) to mimic osteoporosis condition and undecalcified seeded bone scaffold to mimic normal condition. The scaffold's porosity and cell attachment on the scaffolds were determined using scanning electron microscopy. Histological evaluation was used to examine changes in trabecular bone structure. Dual-energy X-ray absorptiometry analysis was performed to determine the bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) of the scaffolds. A compression test was performed to examine the total biomechanical strength of the scaffold. The trabecular thickness and number increased, while the trabecular separation was reduced slightly in DSBS than in DUBS ($P > 0.05$). The BMD and BMC increased significantly ($P < 0.05$), while the compressive strength only increased slightly in DSBS than in DUBS ($P > 0.05$). In conclusion, the *ex vivo* skeletal microenvironment comprising native bovine bone scaffolds seeded with bone cells is structurally,

functionally and mechanically comparable with natural bone. This system may be used as a platform to understand bone physiology and screen for potential drug candidates.

Introduction

Bone is a complex natural nanocomposite and growing tissue made up mostly of collagen and nano-hydroxyapatite (1-3). Bone serves as a protective and supportive framework for the body, as well as a reservoir for essential minerals and production site of blood cells (3). Numerous attempts have been made to design an artificial scaffold that is homogeneous and biocompatible for *in vitro* regeneration of new bone tissues (4,5). A well-designed scaffold derived from natural or synthetic polymer must fulfill specific requirements to support cell growth (6-9). First, the scaffold must be osteoconductive, allowing bone cells to attach to and proliferate on its surface (10-13). The scaffold must also be biocompatible, allowing normal cellular activity without eliciting any harmful effects on the cells (10,14). The combination of these two properties will allow cell proliferation and migration to the inner scaffold and deposition of the bone matrix (4,6). Thus, the newly deposited mineral and matrix should enhance the scaffold biomechanically. Apart from its application in tissue regeneration, a three-dimensional *in vitro* bone cell system that mimics the *in vivo* bone microenvironment would be useful in basic science research of the skeletal system, as well as in testing of osteo-reactive compounds in drug development.

Commonly used synthetic bone scaffold materials include polymers (11,12,15-17), bioceramics (17-20) and hydroxyapatite (21,22). However, currently available synthetic scaffolds do not match the anatomical and physiological structures of normal bone. For instance, collagen-based scaffold does not have the hydroxyapatite mineral component, which is present in bone. The commonly used hydroxyapatite-based scaffold does not have a collagenous matrix, which may retard the growth of bone cells. The absence of either element in the scaffold reduces its biosimilarity with natural bone. Therefore, scaffolds derived from native/natural bone have been proposed as alternatives to synthetic ones due to their

Correspondence to: Professor Soelaiman Ima-Nirwana, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia, Level 17, Preclinical Building, Jalan Yusof Latif, Bandar Tun Razak, Cheras, Wilayah Persekutuan Kuala Lumpur 56000, Malaysia.
E-mail: imasoc@ppukm.ukm.edu.my

Key words: drug screening, *in vitro*, macrophage, skeleton, osteoporosis

REVIEW ARTICLE

The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men

Nur-Vaizura Mohamad, Sok Kuan Wong, Wan Nuraini Wan Hasan, James Jam Jolly, Mohd Fozil Nur-Farhana, Soelaiman Ima-Nirwana and Kok-Yong Chin

Department of Pharmacology, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia

ABSTRACT

Testosterone is the predominant gonadal androgen in men. Low testosterone levels are found to be associated with an increased in metabolic risk and systematic inflammation. Since adipose tissue is a source of inflammatory cytokines, testosterone may regulate inflammation by acting on adipose tissue. This review aimed to explore the role of testosterone in inflammation and its mechanism of action. Both animal studies and human studies showed that (1) testosterone deficiency was associated with an increase in pro-inflammatory cytokines; (2) testosterone substitution reduced pro-inflammatory cytokines. The suppression of inflammation by testosterone were observed in patients with coronary artery disease, prostate cancer and diabetes mellitus through the increase in anti-inflammatory cytokines (IL-10) and the decrease in pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α). Despite these, some studies also reported a non-significant relationship. In conclusion, testosterone may possess anti-inflammatory properties but its magnitude is debatable. More evidence is needed to validate the use of testosterone as a marker and in the management of chronic inflammatory diseases.

ARTICLE HISTORY

Received 16 April 2018
Revised 26 May 2018
Accepted 26 May 2018
Published online 20 June 2018

KEYWORDS

Androgen; inflammation; interleukins; inflammatory markers

Introduction

Inflammation is an important classic host defense mechanism against infection and injury. It is also intimately linked with a broad range of noninfectious diseases. Increasing evidence showed that chronic inflammation contributes to the pathogenesis of many common diseases, such as diabetes, cardiovascular, metabolic, and autoimmune disease. Many studies have investigated the possible involvement of gonadal hormones in inflammatory process in the body. Indeed, several lines of evidence suggest that androgen can act as a modulator for inflammation in men [1,2]. Besides, human cross-sectional studies have suggested an inverse relationship between serum testosterone level and inflammatory markers in men with stable coronary artery disease (CAD) [3], young men [4], and older men [5]. These findings reiterated that low testosterone levels might trigger the occurrence of inflammation-related diseases.

In addition, low testosterone levels have been associated with increase fat mass. Some scientists have speculated that adipose tissue functions as a complex endocrine organ rather than just a storage for energy

[6,7]. Adipose tissue in inflamed condition expresses aromatase to convert testosterone to estradiol, thus decreasing testosterone levels [8]. Excessive visceral fat is a cause of chronic inflammation because adipose tissue is a major source of pro-inflammatory mediators [9]. A cross-sectional study demonstrated that low testosterone, lean body mass, as well as high fat mass, interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) were observed in patients with cancer and cachexia as compared to non-cancer controls [10]. Induction of inflammation was also observed in prostate cancer patients as indicated by a strong association between lipoprotein profile (cholesterol, high-density lipoprotein, and triglyceride (TG)) and androgens [11].

The role of androgen as an anti-inflammatory hormone is further demonstrated by testosterone supplementation trial indicating a suppression of pro-inflammatory markers in either young or old hypogonadal men [12]. Experimental studies also showed that pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) could inhibit testosterone secretion by modulating the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [2,13]. The occurrence of hypogonadotropic hypogonadism

CONTACT Kok-Yong Chin chinkokyoung@ppm.unikom.edu.my Department of Pharmacology, Level 17, Preclinical Building, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Jalan Yacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

ABSTRAK DALAM PERSIDANGAN

1. Pembentang Lisan

Nama Persidangan:

30th Scientific Meeting Malaysia Society of Physiology and Pharmacology (MSPP).
Putrajaya.

Tajuk:

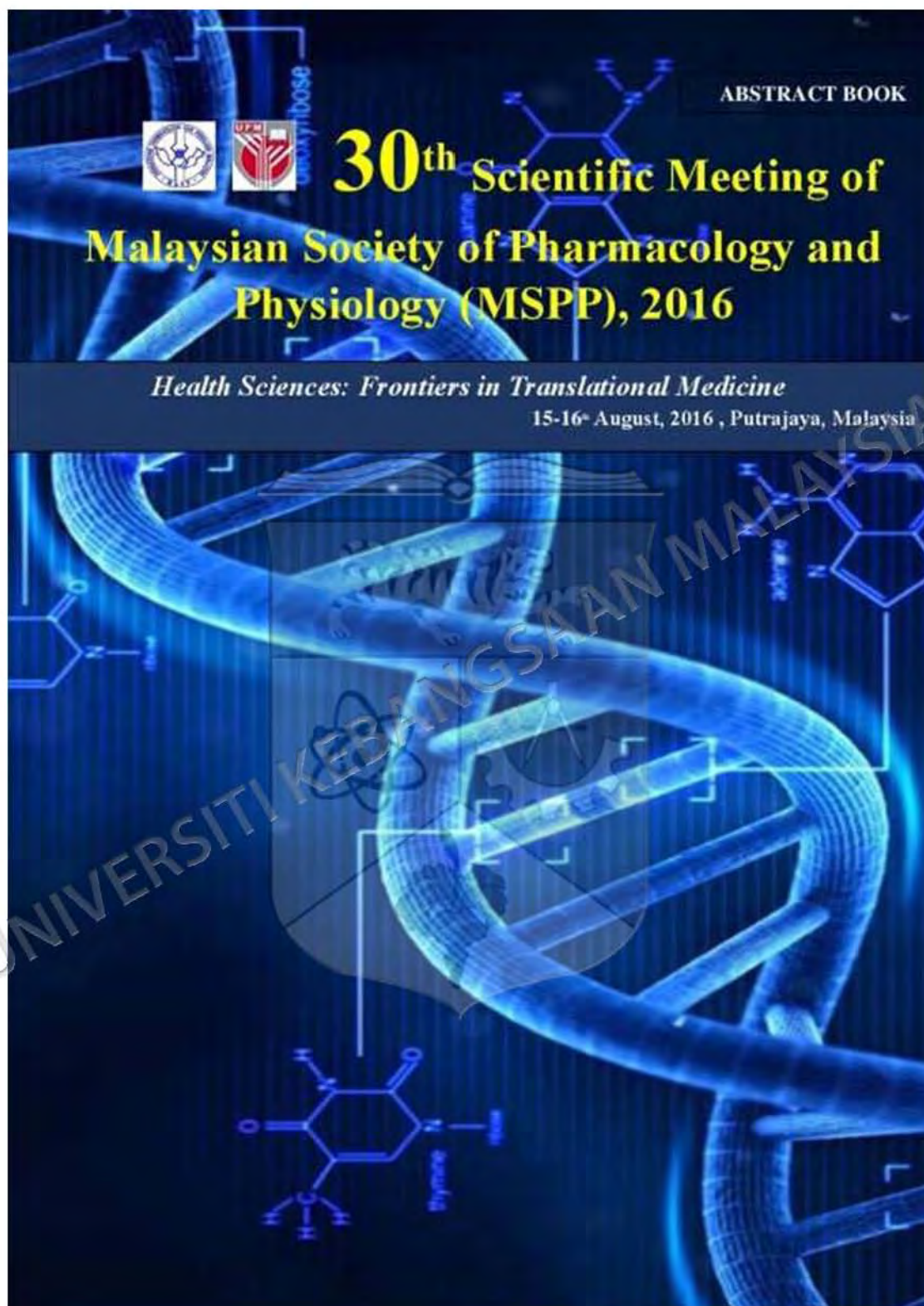
Potential of Vitamin E Isomers on Human Osteoblast hFOB 1.19 cells : A Preliminary Study.

Penulis:

Nur Farhana Mohd Fozi, Ekram Alias, Chua Kien Hui, Ima Nirwana Soelaiman.

Tahun:

2016



POS007

Potential of Vitamin E Isomers on Human Osteoblast hFOB 1.19 Cells: A Preliminary StudyNur Farhana Mohd Fozi ¹, Ekram Alias ², Chua Kien Hui ³, Ima Nirwana Soelaiman ¹¹ Department of Pharmacology, ² Department of Biochemistry and ³ Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

Several in vivo studies have shown that supplementation with vitamin E can improve bone structural and bone mechanical properties in animal models of osteoporosis. In this study we aimed to assess the cell viability and proliferative effect of Tocotrienol isomers in human osteoblast, hFOB1.19. Human Osteoblast hFOB1.19 was purchased from ATCC. Cells were seeded in 96 well culture plates at a density of 1x10³ per well and incubated overnight in growth media, DMEM F12 and 10% fetal bovine serum. After 24 hours, the cells were cultured in osteoblastic differentiation media (growth media +3mM Sodium Phosphate + 50µg/mL Ascorbic Acid). Cells were exposed to individual tocotrienol isomers (̂±-,̂²-,̂¹-,̂³- tocotrienol) at various concentrations (1nM - 1000nM). The control group was treated with Osteoblastic Differential Media only. Cell viability was assessed using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl) 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay and analysed by microtiter plate reader at 490 nm. The percentage of viability hFOB1.19 cells was significantly increased at lower doses (1nM - 1000nM) as compared to the control group. ̂¹- and ̂³-tocotrienol showed significantly increased of viability cells. Vitamin E isomers have the potential of enhancing cell viability and proliferation of hFOB1.19 cells in a concentration dependent manner.

Keywords: Osteoblast, Tocotrienol isomers, Viability

2. Pembentang Lisan

Persidangan:

3rd International Conference of Medical Science, Putrajaya.

Tajuk:

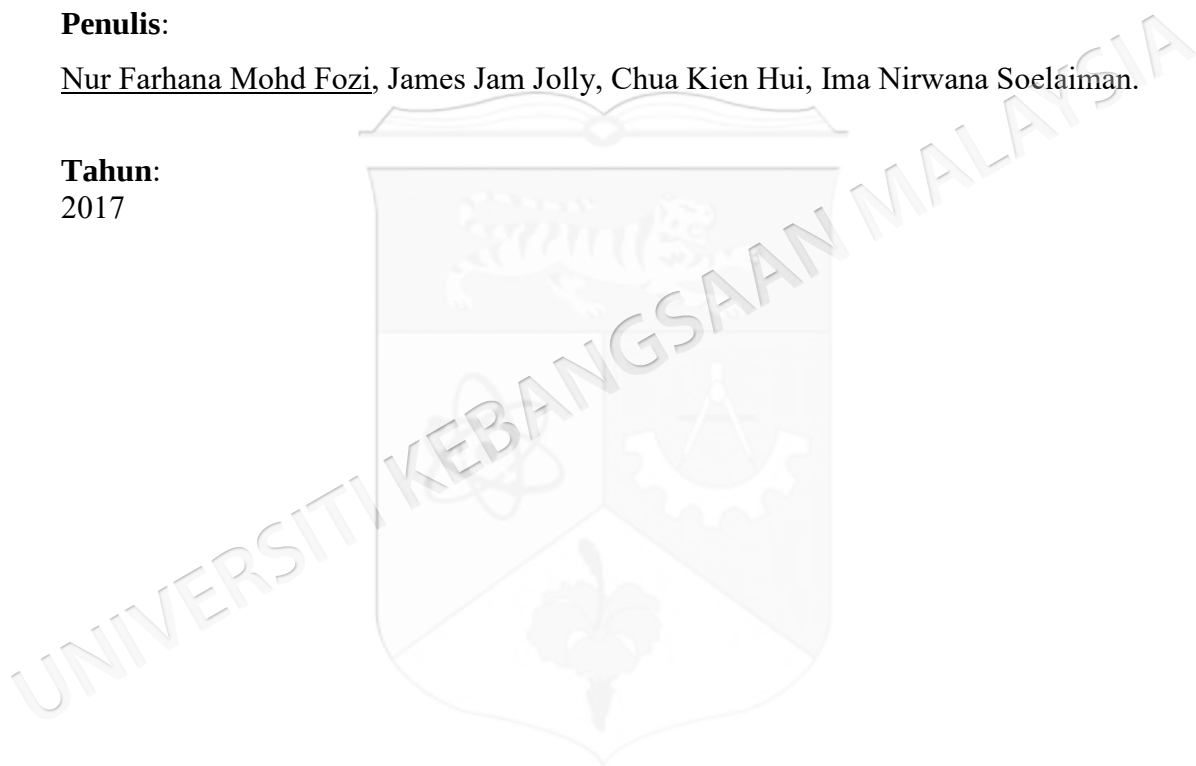
Vitamin E Isomers Promotes Cell Differentiation And Cell Attachment of hFOB 1.19 On Bone Scaffold

Penulis:

Nur Farhana Mohd Fozi, James Jam Jolly, Chua Kien Hui, Ima Nirwana Soelaiman.

Tahun:

2017



*3rd International
Conference on
Advances in Medical
Science*

19th - 20th April 2017

Putrajaya, Malaysia

ABSTRACT BOOK

P7

VITAMIN E ISOMERS PROMOTES CELL DIFFERENTIATION AND CELL ATTACHMENT OF hFOB 1.19 ON BONE SCAFFOLD

Nur Farhana Mohd Fozi¹, James Jam Jolly¹, Chin Kok Yong¹, Ekram Alias², Chua Kien Hui³, Ima Nirwana Soelaiman¹

Departments of Pharmacology¹, Biochemistry² and Physiology³, Faculty of Medicine, Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Wilayah Persekutuan Kuala Lumpur.

Keywords: Vitamin E, ALP activity, hFOB 1.19, cell attachment

Introduction:

Vitamine E is a lipid soluble antioxidant, and has been demonstrated to improve bone structure, and offers protection against osteoporosis.

Aim:

To detect cell attachment of hFOB 1.19 on bone scaffold, and to determine the activity of an early bone marker, alkaline phosphatase (ALP) in cells treated with tocotrienol isomers (α -, β -, γ -, δ -tocotrienol) and α -tocopherol.

Methodology :

The hFOB 1.19 cells were seeded in bovine bone scaffold at a density of 2×10^6 per scaffold, and incubated overnight in a growth media, DMEM F12 and 10% fetal bovine serum. The cells were exposed to individual tocotrienol isomers (α -, β -, γ -, δ -tocotrienol), and α -tocopherol at concentrations of 100 nM. For ALP activity, the cells were treated for 3, 7 and 15 days. The cell suspension at all time-points were measured spectrophotometrically using p-nitrophenylphosphate as the substrate. The media for all the treatment groups were changed every 2 to 3 days. The attachment of hFOB 1.19 on a bone scaffold were observed, and analyzed via scanning electron microscope.

Results

ALP activity showed a gradual increase with the period of incubation, and on day 15, it showed a significantly higher value. Gamma tocotrienol showed the highest ALP activity on day 15 compared to the other isomers. These findings showed that all isomers were significantly increased compared to the control. The SEM micrographs of the analysed cells showed that the hFOB 1.19 were well-attached to the surface. Cells were seen to proliferate on the surface of the bovine bone scaffold. The average mean pore size of the scaffold was 350 μ m.

Conclusion:

Gamma tocotrienol is the most effective isomer of vitamin E in enhancing osteoblast differentiation as indicated by ALP activity and coverage of cell attachment.

3. Pembentang Lisan

Nama Persidangan:

32nd Scientific Meeting Malaysia Society of Physiology and Pharmacology (MSPP).
Putrajaya.

Tajuk:

Vitamin E Isomers Promote Bone Formation and Trabekular Structure on Bovine Bone Scaffold

Penulis:

Nur Farhana Mohd Fozi, Ekram Alias, Chua Kien Hui, Ima Nirwana Soelaiman.

Tahun:

2016





P09

VITAMIN E ISOMERS PROMOTE BONE FORMATION AND TRABECULAR STRUCTURE OF BOVINE BONE SCAFFOLD

Nur Farhana Mohd Fozi¹, James Jam Jolly¹, Chin Kok Yong¹, Chua Kien Hui², Ekram Alias³, Ima ¹Nirwana Soelaiman¹

¹Department of Pharmacology, ²Department of Physiology, ³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Wilayah Persekutuan Kuala Lumpur

Aims: Vitamin E is a strong antioxidant and has been demonstrated to improve bone structure, and offers beneficial effect against osteoporosis. This study aimed to determine osteocalcin level and bone structure in a 3-D bone model treated with tocotrienol isomers (α -, β -, γ -, δ -tocotrienol) and α -tocopherol.

Methods: hFOB 1.19 cells were seeded in bovine bone scaffold at a density of 2×10^6 per scaffold, and incubated overnight in growth media, DMEM F12 and 10% fetal bovine serum. The cells were exposed to individual tocotrienol isomers (α -, β -, γ -, δ -tocotrienol) and α -tocopherol at concentrations of 400 nM. Osteocalcin expression was tested at day 7, 14 and 21. The undecalcified bone scaffold was sectioned and stained using Von Kossa staining.

Results: The osteocalcin levels for the bone scaffolds treated with tocotrienol isomers increased in a time-dependent manner and peaked at day 15. The levels of osteocalcin were higher in the cells treated with γ - and δ -tocotrienol compared to the other tocotrienol isomers. Bone structural histomorphometric analysis showed that the bone scaffolds treated with γ - and δ -tocotrienol showed significant increased bone surface, bone parameter, trabecular thickness and bone volume compared to other groups.

Conclusion: γ - and δ -tocotrienol showed the best results in terms of trabecular structure and enhancement of osteoblast mineralization as indicated by the osteocalcin expression.

LAMPIRAN C

Elabscience®

Document number : ELAB-EK-2016-1124-037

Certificate of Analysis

Production No.	E-EL-H1343	Lot No.	AK0016NOV24037
Format	96T	Date	2016-11-24
Production Name	Human OC/BGP (Osteocalcin)ELISA Kit		

Items	Standard	
	No surface damage	
	Labels are correct	
	Operating Instructions are correct	
Package	All reagent are fully equipped, full dosed and lids are all tightened	
	Liquid reagents are transparent, have no sediment or floccule	
	ELISA Plate is evacuated and have no air leak	
	Accessories are complete	
Standard Curve	linearly dependent coefficient > 0.9900	
Intra-assay Precision(CV)	< 10%	
Result	Qualified	
Operator	Checker	Auditor

Quality Control Approved

Elabscience Biotechnology Co.,Ltd
 Website : www.elabscience.com
 Technical Support : techsupport@elabscience.com
 Address : Building 4, Room 401, Guangdong Science and Technology Industry Park, Wuhan, Hubei Province, China

Date: 2016-11-24

QC PASS

Elabscience®

Assay Procedure for Sandwich-ELISA

Reagent preparation

1. Dilute the Concentrated Wash Buffer(1:25).
2. Dilute the Reference Standard to different concentrations.
3. Dilute the Biotinylated Detection Ab(1:100) 15minutes earlier before step 2.
4. Dilute the Concentrated HRP Conjugate(1:100) 15minutes earlier before step 4.

Assay procedure

- ☐ 1. Add 100μL standard or sample to each well. Incubate 90minutes at 37°C.
- ☐ 2. Remove the liquid. Add 100μL Biotinylated Detection Ab. Incubate 1 hour at 37°C.
9900ul diluent : 100ul Ab
- ☐ 3. Aspirate and wash 3 times.
- ☐ 4. Add 100μL HRP Conjugate. Incubate 30 minutes at 37°C.
9900ul diluent : 100ul HRP conj
- ☐ 5. Aspirate and wash 5 times.
- ☐ 6. Add 90μL Substrate Reagent. Incubate 15 minutes at 37°C.
- ☐ 7. Add 50μL Stop Solution. Read at 450nm immediately.
- ☐ 8. Calculation of results.

Reminding

1. This is only a brief instruction to the experiment operation, please read the manual for detailed instructions.
2. You could check the ☒ after each step.


ATCC

Product Sheet

hFOB 1.19 (ATCC® CRL-11372™)

Please read this FIRST


 Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is a 1:1 mixture of Ham's F12 Medium/Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 2.5 mM L-glutamine (without phenol red). To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: 0.3 mg/ml G418; fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: hFOB 1.19 (ATCC® CRL-11372™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6587 or 703.365.2700
Fax: 703.385.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 3



Description

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue:

bone

Cell Type: osteoblast; SV40 large T antigen transfected

Age: fetus

Growth Properties: adherent

DNA Profile:

Amelogenin: X

CSF1PO: 10,13

D13S317: 11,12

D16S539: 9,13

D5S818: 11,12

D7S820: 8,10

TH01: 7,9,3

TPOX: 11

VWA: 16,18

Cytogenetic Analysis: diploid, 43%; tetraploid, 57%



Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.



SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.



Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.



Handling Procedure for Frozen Cells

To ensure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 8.0 mL complete culture medium, and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio), and dispense into a 25 cm² culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 34°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.



Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still