

KESAN EKSTRAK ETANOL *GYNURA  
PROCUMBENS* TERHADAP STATUS  
OKSIDATIF, INFLAMASI, REAKTIVITI  
VASKULAR DAN PROFIL METABOLIK  
TIKUS PASCAMENOPAUS DIBERI  
DIET TINGGI LEMAK

KHUZAIDATUL AZIDAH BINTI AHMAD NAZRI

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

KESAN EKSTRAK ETANOL *GYNURA PROCUMBENS* TERHADAP STATUS  
OKSIDATIF, INFLAMASI, REAKTIVITI VASKULAR DAN PROFIL  
METABOLIK TIKUS PASCAMENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

KHUZAIDATUL AZIDAH BINTI AHMAD NAZRI

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEHI  
IJAZAH DOKTOR FALSAFAH (BIOKIMIA)

FAKULTI PERUBATAN  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
KUALA LUMPUR

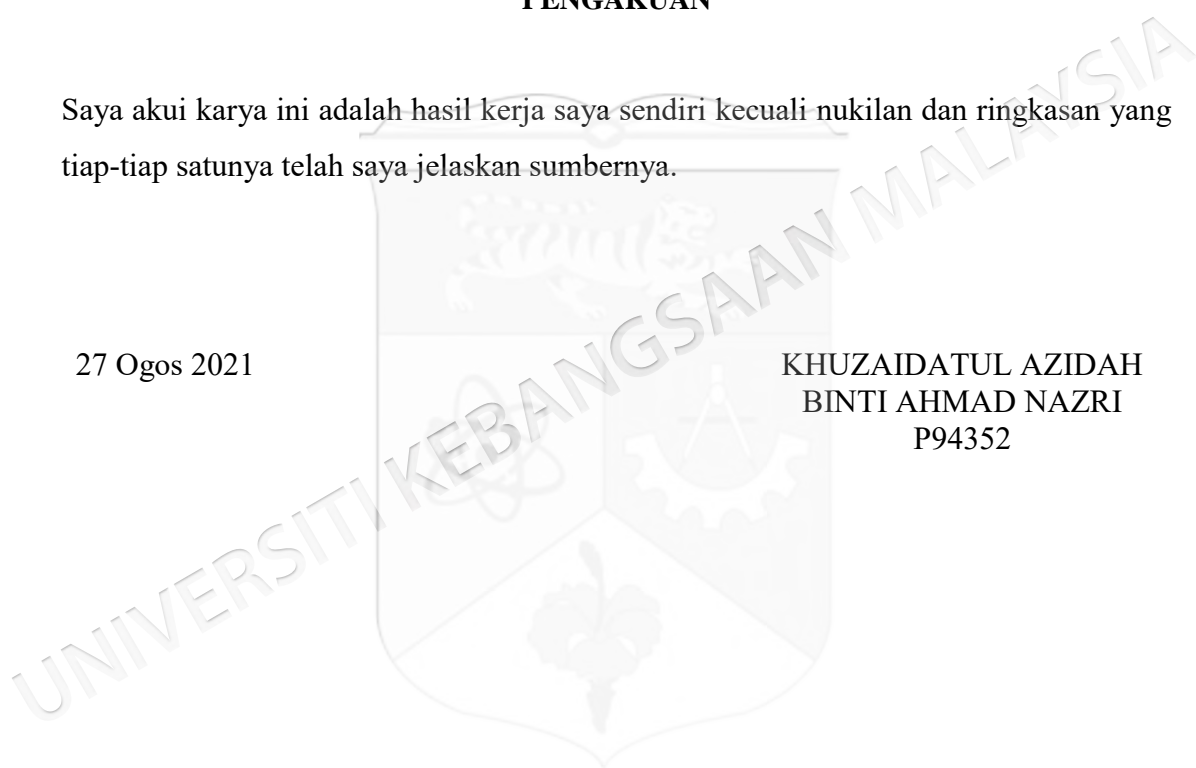
2021

**PENAKUAN**

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

27 Ogos 2021

**KHUZAIDATUL AZIDAH  
BINTI AHMAD NAZRI  
P94352**



## PENGHARGAAN

Segala puji-pujian bagi Allah S.W.T. yang telah mengurniakan semangat kepada saya untuk menyiapkan tesis bagi pengajian Doktor Falsafah ini yang amat mencabar serta menganugerahkan kesihatan yang baik sepanjang pengajian sehingga membolehkan saya menjayakan penyelidikan dan penulisan kajian ini sebagai sebahagian syarat bergraduasi seperti yang telah ditetapkan oleh universiti.

Pada kesempatan ini, saya turut mengucapkan terima kasih kepada penyelia utama, Prof. Madya Dr. Zakiah Jubri @ Mohd Zufri, yang memberi dorongan serta nasihat dalam memperbaiki kualiti penulisan dan penerbitan. Tidak lupa juga kepada penyelia bersama, Prof. Madya Dr. Qodriyah Haji Saad dan Dr. Norsyahidah Mohd Fauzi, atas kegigihan mereka memberi tunjuk ajar sepanjang kerja makmal dijalankan.

Tidak dilupakan penghargaan kepada pihak Universiti Kebangsaan Malaysia kerana menyediakan fasiliti makmal yang serba lengkap dan kondusif melalui Jabatan Biokimia dan Farmakologi di Fakulti Perubatan, PPUKM. Penghargaan ini juga saya panjangkan kepada Kementerian Pertanian dan Asas Tani kerana telah memberi kebenaran dan meluluskan pembiayaan kos penyelidikan (NH1015D076) ini. Saya turut menghargai setiap sumbangan tenaga mahupun idea sama ada besar ataupun kecil daripada pensyarah-pensyarah dan staf yang turut membantu melancarkan perjalanan pengajian dan penyelidikan ini.

Terima kasih saya ucapkan kepada rakan-rakan saya, Mohd Zukri Ngah, Dr. Faizul Jaafar, Dr. Khairul Anwar Zarkasi, Dr. Nurhazirah Zainul Azlan, dan Dr. Sakinah Husna Abd Razak atas idea dan sokongan moral yang berguna.

Akhir sekali, penghargaan tidak terhingga dititipkan kepada semua ahli keluarga yang sentiasa menyokong usaha saya selama ini terutamanya Ahmad Nazri Adnan (ayah), Azimah Md. Yunos (ibu), adik beradik; Izween Asraf Ahmad Nazri, Natasha Nadia Abdul Manan, Mohammad Aizat Ahmad Nazri dan Shamin Iqwan Ahmad Nazri yang sentiasa mendoakan kejayaan saya. Terima kasih atas segalanya.

Wassalamualaikum w.b.t.

## ABSTRAK

Menopaus merupakan satu keadaan yang dialami oleh wanita apabila kitar haid terhenti secara kekal akibat kegagalan ovari bertindak balas dengan hormon gonadotropin untuk menghasilkan estrogen. Estrogen mempunyai pelbagai kesan pelindung termasuk aterospektif terhadap sistem kardiovaskular. Penurunan aras estrogen pada wanita menopaus meningkatkan risiko mereka mendapat penyakit kardiovaskular seperti aterosklerosis. Aterosklerosis terdeteksi apabila inflamasi berlaku disebabkan tekanan oksidatif yang akhirnya mengganggu fungsi normal salur darah. Pengambilan diet tinggi lemak juga meningkatkan risiko aterosklerosis. Pada masa ini, statin digunakan sebagai rawatan aterosklerosis tetapi mungkin memberikan kesan sampingan jika diambil untuk jangka masa panjang. Rawatan alternatif dengan *Gynura procumbens* (GP) dicadangkan kerana mengandungi antioksidan seperti kaempferol, kuersetin dan asid klorogenik yang mempunyai kesan antihipertensi, antihiperlipidemia dan anti-inflamasi. Kajian ini bertujuan untuk menentukan kesan pelindung kardio ekstrak etanol *Gynura procumbens* terhadap status oksidatif, inflamasi, reaktiviti vaskular dan profil metabolomik pada tikus pascamenopaus diberi diet tinggi lemak (PM). GP diekstrak dengan 80% etanol dan komponen bioaktif ditentukan menggunakan LCMS. Tikus dibahagi kepada lapan kumpulan iaitu kawalan, 250GP (250 mg/kg GP), 500GP (500 mg/kg GP), ATV (10 mg/kg atovarstatin), PM, PM+250GP, PM+500GP dan PM+ATV. Atovarstatin adalah kawalan positif. GP dan ATV diberi secara oral sekali setiap hari selama 6 bulan. Tekanan darah sistolik (SBP) diukur menggunakan kaedah kuf ekor dan darah diambil di awal kajian dan setiap bulan melalui sinus orbital. Reaktiviti vaskular aorta diukur menggunakan mandian organ, pengumpulan titik lemak pada tisu aorta diukur dengan pewarnaan minyak merah O, sementara pewarnaan *Verhoeff van Gieson* mengukur ketebalan tunika media, intima serta lumen. Profil lipid, aktiviti enzim antioksidan, aras penanda inflamasi, ujian fungsi hepar dan ginjal serta malondialdehid (MDA) plasma diukur. Profil metabolit aorta ditentukan menggunakan LCMS-MS. Hasil kajian menunjukkan SBP kumpulan PM meningkat dengan signifikan pada bulan pertama hingga akhir kajian dan menurun ke julat normal dengan suplementasi GP dos 250 dan 500 mg/kg. GP dan ATV mengurangkan penimbunan lemak di media tunika aorta PM. Aras aspartat transaminase, alamin transaminase, alkalina fosfatase, bilirubin, asid urik, urea dan kreatinin yang meningkat pada PM menurun ke aras normal dengan suplementasi GP. Penurunan vasodilasi dan peningkatan vasokonstriksi PM diperbaiki dengan suplementasi GP, selaras dengan peningkatan aras nitrik oksida dan nitrik oksida jenis endotelium plasma. Suplementasi GP menurunkan aras kolesterol jumlah, triasilgliserol jumlah, lipoprotein berketumpatan rendah (LDL) dan MDA ke aras normal pada bulan ketiga dan keenam, dan meningkatkan aras lipoprotein berketumpatan tinggi (HDL) kumpulan PM. Aktiviti enzim antioksidan PM meningkat dengan suplementasi GP pada bulan ketiga dan keenam. Suplementasi GP menurunkan ekspresi molekul lekatan intersel terlarut-1 (sICAM-1), molekul lekatan vaskular terlarut-1 (sVCAM-1), faktor nekrosis tumor- $\alpha$ , interleukin-6 dan protein C reaktif kumpulan PM. Sebanyak 21 metabolit berubah dalam PM berbanding kawalan, 15, 26 dan 11 metabolit dalam kumpulan PM+250GP, PM+500GP dan PM+ATV masing-masing berbanding kumpulan PM. Diet tinggi lemak meningkatkan perubahan lipatan (FC) asid 20-hidroksikosatetraenoik, 2-metoksiestradiol dan lipoksin A5 masing-masing sebanyak 7.18, 3.4 dan 5.28 kali ganda dan menurunkan FC glutation (GSH) dan sfinganina 4.4 dan 5.2 kali ganda berbanding kawalan. Suplementasi GP meningkatkan FC GSH dan sfinganina 7.1 dan 4.7 kali ganda serta menurunkan FC asid 20-hidroksikosatetraenoik, 2-metoksiestradiol dan lipoksin A5, 3.6, 2.84 dan 4.8 kali ganda berbanding PM. Kesimpulannya, *Gynura procumbens* menurunkan kerosakan oksidatif melalui peningkatan aktiviti enzim antioksidan dan perencatan inflamasi yang meningkatkan fungsi endotelium dan mengekalkan reaktiviti vaskular serta menormalkan aras tekanan darah. Kesan atherospektif ini mungkin melibatkan tapak jalan eikosanoid dan glutation.

## EFFECTS OF ETHANOLIC *GYNURA PROCUMBENS* EXTRACT ON OXIDATIVE STATUS, INFLAMMATION, VASCULAR REACTIVITY AND METABOLIC PROFILE IN POSTMENOPAUSAL RAT FED WITH HIGH-FAT DIET

### ABSTRACT

Menopause is a condition experienced by women when the menstrual cycle stops permanently due to the failure of the ovaries to respond to gonadotropin hormone to produce oestrogen. Oestrogen has various protective effects including atheroprotective on the cardiovascular system. A decrease in oestrogen levels in menopausal women increases their risk of getting cardiovascular diseases such as atherosclerosis. Atherosclerosis is triggered when inflammation occurs due to oxidative stress which eventually disrupts the normal function of blood vessels. Consumption of a high-fat diet also increases the risk of atherosclerosis. Currently, statins are used as a treatment for atherosclerosis but might give side effects if taken in long-term. Alternative treatment with *Gynura procumbens* (GP) is recommended because it contains antioxidants such as kaempferol, quercetin and chlorogenic acid that exert antihypertensive, anti-hyperlipidaemia and anti-inflammatory effects. This study aimed to determine the cardioprotective effect of *Gynura procumbens* ethanol extract on oxidative status, inflammation, vascular reactivity and metabolomic profile in postmenopausal rats given a high-fat diet (PM). GP was extracted with 80% ethanol and the bioactive components were determined using LCMS. Rats were divided into eight groups namely control, 250GP (250 mg/kg GP), 500GP (500 mg/kg GP), ATV (10 mg/kg atorvastatin), PM, PM+250GP, PM+500GP and PM+ATV. Atorvastatin was the positive control. GP and ATV were given orally once daily for 6 months. Systolic blood pressure (SBP) was measured using a tail-cuff method and blood was taken at the beginning of the study and monthly through orbital sinuses. Aortic vascular reactivity was measured using an organ bath, fat deposition on aortic tissue was measured with O red oil staining, while *Verhoeff van Gieson* staining measured the thickness of the media tunica, intima and lumen. Lipid profiles, antioxidant enzyme activity, inflammatory marker levels, liver and kidney function tests as well as plasma malondialdehyde (MDA) were measured. The profile of aortic metabolites was determined using LCMS-MS. The results showed that SBP of PM group increased significantly in the first month until end of the study and decreased to the normal range with GP supplementation at doses of 250 and 500 mg/kg. GP and ATV reduced fat accumulation in the PM aortic tunica media. Increased levels of aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase, bilirubin, uric acid, urea and creatinine in PM were decreased to normal levels by *Gynura procumbens* supplementation. The decrease in vasodilation and increased vasoconstriction in PM were improved with GP supplementation, consistent with increased levels of plasma nitric oxide and endothelium nitric oxide. Supplementation of GP lowered the levels of total cholesterol, total triacylglycerol, low-density lipoprotein (LDL) and MDA to normal levels at 3 and 6 months and increased the levels of high-density lipoprotein (HDL) of the PM group. Activity of enzyme antioxidant in PM increased with GP supplementation at months 3 and 6. Supplementation with GP decreased the expression of soluble intracellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), soluble vascular adhesion molecule-1 (sVCAM-1), necrosis factor tumor-alpha, interleukin-6 and C reactive protein of the PM group. A number of 21 metabolites were changed in PM compared to control, 15, 26 and 11 metabolites in the PM+250GP, PM+500GP and PM+ATV groups respectively compared to the PM group. The high-fat diet increased the fold change (FC) of 20-hydroxyicosatetraenoic acid, 2-methoxyestradiol and lipoxin A5 by 7.18, 3.4 and 5.28-fold, respectively, and decreased FC of glutathione (GSH) and sphinganine by 4.4 and 5.2-fold compared to the control. Supplementation with GP increased FC of GSH and sphinganine by 7.1 and 4.7-fold, and also decreased FC of 20-hydroxyicosatetraenoic acid, 2-methoxyestradiol and lipoxin A5 by 3.6, 2.84 and 4.8-fold compared to the PM. In conclusion, *Gynura procumbens* decreased oxidative damage by increasing the activity of antioxidant enzymes and inhibiting inflammation that enhanced endothelial function and maintained vascular reactivity as well as normalized blood pressure levels. The atheroprotective effects may involve eicosanoid and glutathione pathway.

## KANDUNGAN

		Halaman
<b>PENGAKUAN</b>		<b>ii</b>
<b>PENGHARGAAN</b>		<b>iii</b>
<b>ABSTRAK</b>		<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>		<b>v</b>
<b>KANDUNGAN</b>		<b>vi</b>
<b>SENARAI JADUAL</b>		<b>x</b>
<b>SENARAI SINGKATAN</b>		<b>xvi</b>
<b>BAB I</b>	<b>PENDAHULUAN</b>	
1.1	Pengenalan	1
1.2	Objektif	3
	1.2.1 Objektif umum	3
	1.2.2 Objektif khusus	3
1.3	Hipotesis	4
<b>BAB II</b>	<b>KAJIAN KEPUSTAKAAN</b>	
2.1	Menopaus	6
2.2	Aterosklerosis	7
	2.2.1 Jenis-jenis arteri	7
	2.2.2 Mekanisme pembentukan aterosklerosis	10
	2.2.3 Faktor risiko aterosklerosis	16
2.3	Penanda Biologi Aterosklerosis	16
2.4	Antioksidan dan Aterosklerosis	22
2.5	Model Kajian Aterosklerosis Pascamenopaus	24
2.6	<i>Gynura procumbens</i> (Lorr. Mer)	25
	2.6.1 Komposisi <i>Gynura procumbens</i>	27
	2.6.2 Kesan kardioprotektif <i>Gynura procumbens</i> terhadap penyakit kardiovaskular	31
2.7	Kajian Berasaskan Metabolomik	32
	2.7.1 Modulasi profil metabolit penyakit kardiovaskular	33

<b>BAB III</b>	<b>BAHAN DAN KAEDAH</b>	
3.1	Bahan	36
	3.1.1 Tumbuhan kajian	36
	3.1.2 Haiwan kajian	36
	3.1.3 Bahan kimia dan alat radas	36
3.2	Reka Bentuk Kajian	49
3.3	Kaedah	51
	3.3.1 Pengekstrakan <i>Gynura Procumben</i>	51
	3.3.2 Eksperimen	53
	3.3.3 Prosedur pembedahan haiwan	54
	3.3.4 Penyediaan diet haiwan	55
	3.3.5 Penyediaan <i>Gynura procumbens</i> dan atorvastatin	56
	3.3.6 Pengambilan sampel darah	57
	3.3.7 Pengukuran berat badan tikus kajian	57
	3.3.8 Pengukuran tekanan darah tikus kajian	57
3.4	Pengukuran Parameter Biokimia	58
	3.4.1 Penentuan morfometri aorta menggunakan pewarnaan Verhoeff van Gieson	58
	3.4.2 Penentuan titik lipid aorta menggunakan pewarnaan minyak merah O	58
	3.4.3 Penentuan ujian fungsi hepar dan ginjal tikus pascamenopaus	59
	3.4.4 Profil lipid tikus pascamenopaus	59
	3.4.5 Penentuan aras malondialdehid plasma tikus menopaus	61
	3.4.6 Penentuan aktiviti enzim antioksidan eritrosit	62
	3.4.7 Reaktiviti vaskular	64
	3.4.8 Penentuan aras nitrik oksida plasma tikus menopaus	66
	3.4.9 Penentuan aras nitrik oksida sintase jenis endotelium plasma	67
	3.4.10 Penentuan aras nitrik oksida sintase jenis induksi plasma	67
	3.4.11 Penentuan isyarat vaskular endotelium aorta	68
3.5	Analisis Metabolomik Aorta	69
	3.5.1 Homogenisasi tisu aorta	69
	3.5.2 Rekonstitusi sampel	69
	3.5.3 Kromatografi cecair-spektrometri jisim (LC-MS) tidak bersasar	70
3.6	Analisis Statistik	75
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL KAJIAN</b>	
4.1	Komponen Bioaktif Ekstrak 80% Etanol <i>Gynura procumbens</i>	77
4.2	Berat Badan Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	80

4.3	Tekanan Darah Sistolik Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	82
4.4	Kajian Morfologi Tisu Aorta Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	84
4.4.1	Tisu aorta dengan pewarnaan Verhoeff van Gieson	85
4.4.2	Tisu Aorta dengan Pewarnaan Minyak Merah O	87
4.5	Kajian Histomorfometrik Tisu Aorta Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	88
4.6	Ujian Fungsi Hepar dan Ginjal Serum Tikus Menopaus	90
4.7	Profil Lipid Serum Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	93
4.7.1	Aras triasilgliserol jumlah serum	93
4.7.2	Aras kolesterol jumlah serum	95
4.7.3	Aras lipoprotein berketumpatan rendah serum	97
4.7.4	Aras lipoprotein berketumpatan tinggi serum	99
4.8	Aras Malondialdehid Plasma Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	100
4.9	Aktiviti Enzim Antioksidan Eritrosit Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	102
4.9.1	Enzim katalase	103
4.9.2	Enzim glutathion peroksidase	105
4.9.3	Enzim superoksida dismutase	107
4.10	Kereaktifan Vaskular Aorta Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	109
4.10.1	Kereaktifan vaskular aorta aruhan asetikolin	109
4.10.2	Kereaktifan vaskular aorta aruhan natrium nitroprusida	111
4.10.3	Kereaktifan vaskular aorta aruhan natrium fenilefrin	113
4.11	Aras Nitrik Oksida Plasma Tikus Menopaus	115
4.12	Aras Kepekatan Nitrik Oksida Sintase Jenis Endotelium Plasma Tikus Menopaus	117
4.13	Aras Kepekatan Nitrik Oksida Sintase Jenis Induksi Plasma Tikus Menopaus	118
4.14	Aras Penanda Inflamasi Plasma Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	120
4.14.1	Aras interlukin-6	121
4.14.2	Aras faktor nekrosis tumor -alfa	123
4.14.3	Aras protein reaktif c	125
4.15	Isyarat Vaskular Endotelium Aorta Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	127
4.15.1	Aras molekul lekatan vaskular terlarut-1	127
4.15.2	Aras molekul lekatan intersel terlarut-1	129

4.16	Profil Metabolomik Tikus Menopaus diberi Diet Tinggi Lemak	131
4.16.1	Perubahan profil metabolit global aorta	131
4.16.1	Analisis perubahan lipatan	136
4.16.2	Analisis tapak jalan	140

## **BAB V PERBINCANGAN**

## **BAB VI KESIMPULAN**

6.1	Kesimpulan Kajian	164
-----	-------------------	-----

## **RUJUKAN 166**

## **LAMPIRAN**

Lampiran A	Surat Kelulusan Jawatankuasa Etika Penggunaan Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC)	182
Lampiran B	Surat Kelulusan Menjalankan Penyelidikan	183
Lampiran C	Surat Kelulusan Dana Penyelidikan	184
Lampiran D	Bengkel Pengendalian Haiwan	185
Lampiran E	Jurnal Yang Telah Diterbitkan	186
Lampiran F	Jurnal Yang Telah Diterbitkan	187
Lampiran G	Jurnal Yang Telah Diterbitkan	188
Lampiran H	Abstrak Pembentangan Oral Persidangan Antarabangsa Antioksi dan Penyakit Degeneratif (ICADD) Tahun 2018	189
Lampiran I	Abstrak Pembentangan Poster Persidangan Antarabangsa Antioksi dan Penyakit Degeneratif (ICADD) Tahun 2018	190
Lampiran J	Abstrak Pembentangan Poster Persidangan Pertubuhan Jantung Kebangsaan Malaysia Tahun 2019	191

## SENARAI JADUAL

<b>No. Jadual</b>		<b>Halaman</b>
Jadual 2.1	Jenis Spesis Oksigen Reaktif	20
Jadual 2.2	Struktur Kimia Komponen Bioaktif Ekstrak <i>Gynura procumbens</i>	27
Jadual 3.1	Komposisi larutan Kreb's	66
Jadual 3.2	Kepekatan larutan piawai mengikut julat penyerapan sampel	66
Jadual 4.1	Masa tahanan (RT) dan puncak ion molekul komponen bioaktif yang dikenalpasti dalam ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i>	76
Jadual 4.2	Ukuran ketebalan dan luas aorta serta diameter lumen bagi tikus kumpulan sham dan pascamenopaus	89
Jadual 4.3	Ujian fungsi hepar serum bagi tikus kumpulan sham dan PM dengan suplementasi ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> pada dos 250 dan 500 mg/kg di awal (0 bulan) dan akhir (6 bulan) kajian	90
Jadual 4.4	Ujian fungsi ginjal serum bagi tikus kumpulan sham dan PM dengan suplementasi ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> pada dos 250 dan 500 mg/kg di awal dan akhir kajian	91
Jadual 4.5	Senarai tapak jalan yang terkesan dalam kumpulan PM vs kawalan, PM+250GP vs PM, PM+500GP vs PM dan PM+ATV vs PM	142

## SENARAI RAJAH

No. Rajah		Halaman
Rajah 2.1	Struktur Keratan Rentas Arteri	9
Rajah 2.2	Mekanisme Pembentukan Aterosklerosis	10
Rajah 2.3	Struktur Kolesterol	17
Rajah 2.4	Tindak Balas Terhadap Penghasilan ROS	20
Rajah 2.5	Sintesis Malondialdehid Melalui Tapak Jalan Peroksidasi Lipid Terhasil Melalui Tekanan Oksidatif.	21
Rajah 2.6	Sistem Glutation Peroksidase.	24
Rajah 2.7	<i>Gynura Procumbens</i> .	26
Rajah 4.1	Kromatogram penuh LCMS ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i>	78
Rajah 4.2	Kesan suplementasi ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> terhadap berat tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata $\pm$ sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )	80
Rajah 4.3	Kesan suplemen ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> terhadap berat badan tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata $\pm$ sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )	81
Rajah 4.4	Kesan suplemen ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> terhadap tekanan darah sistolik tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata $\pm$ sisihan	

- piawai (n=6). a perbezaan signifikan berbanding kawalan, b perbezaan signifikan berbanding PM dan c perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 83
- Rajah 4.5 Fotomikrograf tisu aorta dengan pewarnaan VvG bagi kumpulan (A) kawalan, (B) 250GP, (C) 500GP, (D) ATV, (E) PM, (F) PM+250GP, (G) PM+500GP dan (H) PM+ATV pada pemerhatian mikroskop di bawah pembesaran magnifikasi X40 85
- Rajah 4.6 Fotomikrograf tisu aorta dengan pewarnaan ORO bagi kumpulan (A) kawalan, (B) 250GP, (C) 500GP, (D) ATV, (E) PM, (F) PM+250GP, (G) PM+500GP dan (H) PM+ATV pada pemerhatian mikroskop di bawah pembesaran magnifikasi X40 87
- Rajah 4.7 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras triasilgliserol jumlah tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). a perbezaan signifikan berbanding kawalan, b perbezaan signifikan berbanding PM dan c perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 93
- Rajah 4.8 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras kolesterol jumlah tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 95
- Rajah 4.9 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras lipoprotein berketumpatan rendah tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). a perbezaan signifikan berbanding kawalan, b perbezaan signifikan berbanding PM dan c perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 97
- Rajah 4.10 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras lipoprotein berketumpatan tinggi tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ). 99

Rajah 4.11	Kesan suplemen ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> terhadap kepekatan malondialdehid tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata $\pm$ sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ )	101
Rajah 4.12	Kesan suplemen ekstrak 80% etanol	104
Rajah 4.13	Kesan suplemen ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> terhadap aktiviti enzim glutation peroksidase tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata $\pm$ sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ )	105
Rajah 4.14	Kesan suplemen ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> terhadap aktiviti enzim superoksida dismutase tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata $\pm$ sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ )	107
Rajah 4.15	Kesan suplemen ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> terhadap kereaktifan vaskular (relaksasi) aorta aruhan asetilkolin tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata $\pm$ sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan dan <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM ( $p<0.05$ )	109
Rajah 4.16	Kesan suplemen ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> terhadap kereaktifan vaskular (relaksasi) aorta aruhan natrium nitroprusida tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata $\pm$ sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan dan <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM ( $p<0.05$ )	111
Rajah 4.17	Kesan suplemen ekstrak 80% etanol <i>Gynura procumbens</i> terhadap kereaktifan vaskular (konstriksi) aorta aruhan fenilefrin tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata $\pm$ sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan dan <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM ( $p<0.05$ )	113

- Rajah 4.18 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap perubahan peratusan aras nitrit plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan dan <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM ( $p<0.05$ ) 115
- Rajah 4.19 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras kepekatan nitrik oksida sintase jenis endotelium plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 117
- Rajah 4.20 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras kepekatan nitrik oksida sintase jenis induksi plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 119
- Rajah 4.21 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras interleukin-6 plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 121
- Rajah 4.22 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras faktor nekrosis tumor-alfa plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 123
- Rajah 4.23 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras protein reaktif c plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 125
- Rajah 4.24 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras molekul lekatan vaskular terlarut-1 tisu aorta tikus kumpulan

- sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ) 128
- Rajah 4.25 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras molekul lekatan intersel terlarut-1 tisu aorta tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ ). 129
- Rajah 4.26 Plot skor Principal Component Analysis (PCA) mod positif bagi kumpulan (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM. Setiap titik mewakili satu sampel. Setiap titik bulat mewakili satu metabolit 131
- Rajah 4.27 Plot skor Principal Component Analysis (PCA) mod negatif bagi kumpulan (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM. Setiap titik mewakili satu sampel. Setiap titik bulat mewakili satu metabolit 132
- Rajah 4.28 Plot skor Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) mod positif bagi kumpulan (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM. Setiap titik mewakili satu sampel. Setiap titik bulat mewakili satu metabolit 134
- Rajah 4.29 Plot skor Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) mod negatif bagi kumpulan (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM. Setiap titik mewakili satu sampel. Setiap titik bulat mewakili satu metabolit 135
- Rajah 4.30 Analisis tapak jalan menunjukkan laluan metabolik yang terkesan bagi: (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM 144

### SENARAI SINGKATAN

2-ME	2-metoksiestradiol
20-HETE	asid 20-hidroksikosatetraenoik
5HPO	Minyak dipanaskan lima kali
ACE	Enzim penukar angiotensin
ACh	Asetilkolin
AGC	Kawalan kenaikan automatik
ALT	Alanine aminotransferase
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ASEAN	Association of Southeast Asian Nations
AST	Aspartate transminase
ATP	Adenosina trifosfat
ATV	Atorvastatin
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterin
BUN	Urea nitrogen darah
Ca.Cl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Kalsium dwihidrat
CAD	Penyakit arteri koronari
CAT	Katalase
CGA	Asid klorogenik
CH <sub>3</sub> COOH	Asid asetik glasial
CKMB	Kreatina kinase jalur miokardium
CRP	Kinase sintase glikogen 3
DHRC	Pusat Penyelidikan Ubatan dan Herba
DNA	Asid deoksiribonukleik
DNPH	2,4- dinitrofenilhidrazina

eGFR	Anggaran kadar penurasan glomerular
ELISA	Asai rantaian enzim imunosorben
eNOS	Nitrik oksida jenis endotelium
ESI	Ionisasi elektrospray
ETC	Sistem pengangkut elektron
FBG	Glukosa darah semasa berpuasa
FC	Sel busa
FC	Perubahan lipatan
GP	<i>Gynura procumbens</i>
GPx	Glutation peroksidase
GSH	Glutation terturun
GSK3 $\beta$	Kinase sintase glikogen 3 beta
GSSG	Glutation teroksidasi
GSSG-R	Glutation reduktase
H&E	Hematoksilin & eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Molekul air
H <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	Asid sulfurik
HCl	Asid hidroklorik
HClO <sub>4</sub>	Asid perklorik
HDL	Dimetilsulfoksida
HFD	Diet tinggi lemak
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim
	Areduktase
HPLC	Kromatografi cecair berprestasi tinggi
HPO	Dipanaskan berulang kali

HRP	Horseradish peroksida
hsCRP	Protein reaktif C sensitif tinggi
ICAM-1	Molekul-1 lekatan intersel
IEC	Lamina elastik dalaman
IEL	Lamina elastik dalaman
IL-1	Interlukin-1
IL-6	9'-karbodimetilenilhidroksikromanol
IM	Intra otot
IMA	Luas intima-media
IMT	Ketebalan intima-media
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
iNOS	Karboksimetilbutilhidroksilkromanol
IP	Intraperitoneal
KCl	Kalium klorida
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kalium dwihidrogen fosfat
LC-MS/MS	Kromatografi cecair spektrum cecair
LD	Titik lipid
LDL	Lipoprotein berketumpatan rendah
LFT	Ujian fungsi hepar
LOD	Had pengesanan
LOO•	Radikal peroksil
LOQ	Had kuantitasi
LOX-1	protein kinase p38
LPS	Lipopolisakarida

LX	Lipoksin
LXA4	Lipoksin-A4
LXA5	Lipoksin-A5
LXB4	Lipoksin-B4
M-CSF	Faktor penggalak koloni mikrofaej
MCP-1	Protein kemotaktik monosit-1
MCP-1	Protein kemotaktik monosit-1
MDA	Malondialdehid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesium sulfat
MI	Infarksi miokardium
MM-LDL	Minimally modified oxLDL
MMP-1	Siklin bergantung kinase 4
MMP-9	Perencat CDK
NaCl	Natrium klorida
NADPH	Nikotinamida adenina dinukleotida fosfat
NaHCO <sub>3</sub>	Natrium karbonat
NaOH	Natrium hidroksida
NCD	Penyakit tak berjangkit
NF-κB	karboksietilhidroksikromanol
NO	Nitrik oksida
ORO	Minyak merah O
oxLDL	Lipoprotein berketumpatan rendah teroksidasi
PA	Aktiviti fizikal
PBS	Salina penimbal fosfat

PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDA	Foto diod atur
PE	Fenilefrin
PG	Prostaglandin
PM	Pascamenopaus
PMI	Pesakit infarksi miokardium
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster
PUFA	Asid lemak poli tak tepu
QC	Kawalan kualiti
ref	Daya pengemparan relatif
RFT	Ujian fungsi renal
ROS	Spesies oksigen reaktif
RSD	Baki sisihan piawai
RT	Masa tahanan
S	Cerun
SAM	S-adenosilmetiona
SD	Sisihan piawai
sGC	Guanilate siklase jenis larut
SHR	Tikus hipertensi spontan
sICAM-1	Molekul lekatan intersel terlarut-1
SNP	Natrium nitroprusida
SOD	Superoksida dismutase
STZ	Streptozotocin
sVCAM-1	Molekul lekatan vaskular terlarut-1
TBARS	Bahan reaktif asid tiobarbiturik
TC	Kolesterol total

TEP	1,1,3,3-tetraetoksipropana
TG	Triasilgliserol total
TGF- $\beta$	Faktor pertumbuhan transformasi-beta
TI	Tunika intima
TIC	Jumlah ion kromatogram
TM	Tunika media
TMNO	Trimetilamine N-oxide
TNF- $\alpha$	Tumor nekrosis faktor alfa
TP53	Protein Tumor 53
TRF	Fraksi kaya tokotrienol
UKMAEC	UKM Animal Ethical Committee
UV	Sinar ultraungu
VCAM-1	Molekul-1 lekatan vaskular
VIP	<i>Variable Importance in Projection</i>
vLDL	Lipoprotein berketumpatan sangat rendah
VLDL	Lipoprotein berketumpatan sangat rendah
VSMC	Sel otot licin vaskular
VvG	Verhoef van Geosen
WHO	Organisasi Kesehatan Sedunia
XOD	Xanthine oksidase
$\gamma$ -glutamilsisteina	$\gamma$ -GC

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 PENGENALAN**

Menopaus ialah suatu keadaan apabila kitar haid terhenti akibat kegagalan ovari bertindak balas terhadap hormon gonadotropin untuk merembeskan hormon estrogen (Van Kempen et al. 2011). Hormon estrogen mempunyai pelbagai kesan pelindung terhadap sistem kardiovaskular termasuk kesan ateroprotektif (Scheidegger et al. 2000) termasuk kemampuan mempertahankan profil lipid pada aras normal (Luca et al. 2016), bertindak sebagai agen antioksidan dan pelindung jantung semula jadi (Somani et al. 2019). Kehadiran hormon estrogen menyebabkan wanita berisiko rendah untuk mendapat penyakit kardiovaskular berbanding lelaki. Wanita yang berumur melebihi 55 tahun dan ke atas lebih berisiko mendapat penyakit kardiovaskular (Deroo & Korach 2006) seperti penyakit jantung koronari, strok, jantung reumatik, trombosis vena dan aterosklerosis. Penyakit kardiovaskular tercetus apabila inflamasi berlaku disebabkan tekanan oksidatif yang berpunca dari penghasilan radikal bebas dan akhirnya mengganggu fungsi normal salur darah.

Berdasarkan statistik Kementerian Kesihatan Malaysia (KKM), penyakit kardiovaskular berkait dengan aterosklerosis menjadi punca utama kematian di Malaysia sejak 2013 yang merangkumi sebanyak 24.7 peratus kematian (Allender et al. 2008). Pada tahun 2016, Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) menganggarkan hampir 17.9 juta atau 44% pesakit penyakit kronik tidak berjangkit (NCD) maut akibat penyakit kardiovaskular (Allender et al. 2008; Thangiah et al. 2020). Jumlah kematian dijangka meningkat kepada 23.3 juta kes menjelang tahun 2030 (Mendis et al. 2011). Kini, penyakit kardiovaskular kekal menjadi penyebab kematian nombor satu di

Malaysia dan kedua tertinggi dikalangan negara-negara ASEAN yang mencatatkan kes kematian akibat kardiovaskular (Lim et al. 2019; Tee et al. 2020).

Aterosklerosis adalah penyakit inflamasi vaskular kronik yang disebabkan oleh penebalan dinding arteri serta pengerasan dinding pembuluh darah secara perlahan. Ia berpunca daripada pengumpulan lemak dan kolesterol di dalam sel endotelium serta proliferasi sel otot licin (Hooper et al. 2020). Faktor risiko yang menyumbang kepada penyakit aterosklerosis adalah hiperkolesterolemia, hipertensi, merokok, obesiti, gaya hidup yang tidak aktif, genetik dan sejarah penyakit dalam keluarga (Bays 2020; Insull Jr 2009). Selain daripada itu, faktor pemakanan juga memainkan peranan kepada penyakit aterosklerosis. Tabiat pengambilan makanan yang kaya dengan asid lemak tepu (Heidarian et al. 2014) secara berlebihan berupaya untuk meningkatkan risiko aterosklerosis (Dinicolantonio et al. 2016; Lopez-Garcia et al. 2005; Misra et al. 2019). Aterosklerosis dapat dicegah melalui gaya hidup sihat seperti bersukan, mengamalkan pemakanan sihat dengan diet yang seimbang dan melalui rawatan klinikal dengan menggunakan ubat-ubatan seperti statin yang digunakan untuk mengawal aras kolesterol darah dikalangan pesakit hipertensi (He et al. 2014). Namun demikian, statin mempunyai kesan sampingan pada penggunaan jangka masa panjang seperti kerosakan pada otot skeletal (miopati) dan peningkatan enzim hepar seperti aspartat aminotransferase (AST) dan alanina aminotrasferase (ALT) (Escobar et al. 2008). Tindakan statin juga dilaporkan masih tidak mencukupi untuk mencegah perkembangan aterosklerosis (Tien et al. 2012; Hoffmann et al. 2010). Oleh itu, alternatif lain perlu diambil dalam mencegah perkembangan aterosklerosis.

*Gynura procumbens* Lour. Merr (keluarga *Compositae*), merupakan tumbuhan herba di Malaysia yang juga dikenali sebagai pokok "Sambung nyawa". Ia digunakan dalam perubatan tradisional untuk merawat sakit buah pinggang, reumatik, kencing manis, sembelit, ruam, demam dan juga sebagai bahan untuk merawat luka (Kaewseejan et al. 2015). Selain di Malaysia, tumbuhan ini juga banyak didapati di negara Asia Tenggara, terutamanya Indonesia, China, Vietnam dan Thailand (Tan et al. 2016). Kajian lepas mendapati, tumbuhan ini mempunyai potensi terapi yang tinggi untuk merawat pelbagai jenis penyakit seperti herpetik (Jarikasem et al. 2013), hiperlipidemia (Zhang & Tan 2000), hipertensi (Lu et al. 2012), hiperglisemia (Algariri

et al. 2014) selain bertindak sebagai agen anti-inflamasi (Iskander et al. 2011) dan antioksidan (Puangpronpitag et al., 2010). Komponen bioaktif dalam ekstrak *Gynura procumbens* seperti kaempferol, quercetin, kaempferol-3-O-rutinosida, rutin dan asid klororogenik dilaporkan sebagai pelindung jantung melalui penurunan tekanan darah dan penurunan LDL dalam darah (Ashraf 2019; Murugaiyah et al. 2018).

## 1.2 OBJEKTIF

### 1.2.1 Objektif Umum

Kajian ini bertujuan untuk menentukan kesan ekstrak etanol *Gynura procumbens* terhadap status oksidatif, inflamasi, reaktiviti vaskular dan profil metabolik tikus pascamenopaus diberi diet kolesterol diperkaya dengan minyak sawit dipanaskan berulang kali (HPO).

### 1.2.2 Objektif Khusus

- a. Menentukan komponen bioaktif dalam ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens*.
- b. Menentukan profil lipid plasma (lipoprotein berketumpatan tinggi dan rendah; HDL dan LDL), kolesterol jumlah (TC) dan triasilgliserol (TG), fungsi hepar (jumlah protein, albumin, globulin bilirubin, alkali fosfatase, aspartat transferase dan alanina transferase) dan ginjal (asid urik, urea, kalsium, anggaran kadar penurasan glomerular dan urea nitrogen darah dan kreatinin) serta tekanan darah sistolik tikus pascamenopaus yang diberi diet tinggi lemak diperkaya dengan HPO dan yang diberi suplemen ekstrak etanol *Gynura procumbens*.
- c. Menentukan perubahan titik lemak serta mengukur nisbah ketebalan tunika intima dan tunika media (TI/TM) aorta tikus pascamenopaus yang diberi diet

diet tinggi lemak diperkaya dengan HPO dan yang diberi suplemen ekstrak etanol *Gynura procumbens*.

- d. Menentukan kesan suplemen ekstrak etanol *Gynura procumbens* terhadap plasma malondialdehid (MDA) dan aktiviti enzim antioksidan (katalase; CAT, glutation peroksidase; GPx dan superoksida dismutase; SOD) dalam eritrosit tikus pascamenopaus yang diberi diet tinggi lemak diperkaya dengan HPO dan yang diberi suplemen ekstrak etanol *Gynura procumbens*.
- e. Menentukan kesan suplemen ekstrak etanol *Gynura procumbens* terhadap fungsi endotelium dengan mengukur reaktiviti vaskular aorta, nitrik oksida (NO) dan nitrik oksida jenis endotelium (eNOS) dalam plasma tikus pascamenopaus yang diberi diet tinggi lemak diperkaya dengan HPO dan yang diberi suplemen ekstrak etanol *Gynura procumbens*.
- f. Menentukan kesan suplemen ekstrak etanol *Gynura procumbens* terhadap penanda inflamasi (interlukin-6; IL-6, tumor nekrosis faktor alfa; TNF-  $\alpha$ , protein rektif C; CRP) dalam plasma dan tisu aorta tikus pascamenopaus yang diberi diet tinggi lemak diperkaya dengan HPO dan yang diberi suplemen ekstrak etanol *Gynura procumbens*.
- g. Menentukan profil metabolik aorta tikus pascamenopaus yang diberi diet tinggi lemak diperkaya dengan HPO dan yang diberi suplemen ekstrak etanol *Gynura procumbens*.

### 1.3 HIPOTESIS

- a. Ekstrak etanol *Gynura procumbens* mengandungi komponen bioaktif yang mengandungi kesan ateroprotektif yang ditunjukkan dengan memperbaiki histomorfometri aorta, mengekalkan fungsi hepar dan ginjal, meningkatkan aras plasma lipoprotein berketumpatan tinggi; HDL dan menurunkan aras lipoprotein berketumpatan rendah; LDL, kolesterol jumlah; TC dan

triasilgliserol jumlah; TG serta menurunkan tekanan darah sistolik tikus pascamenopaus ke aras normal.

- b. Ekstrak etanol *Gynura procumbens* memperbaiki fungsi endotelium dengan meningkatkan reaktiviti vaskular, aras plasma nitrik oksida (NO), nitrik oksida jenis endotelium (eNOS), menurunkan ekspresi penanda inflamasi plasma; interlukin-6; IL-6, tumor nekrosis faktor alfa; TNF-  $\alpha$ , protein rektif C; CRP serta aorta; molekul lekatan intersel-1; sICAM-1 dan molekul lekatan vaskular-1; sVCAM-1 dan meningkatkan aktiviti enzim antioksidan (katalase; CAT, glutation peroksidase; GPx dan superoksida dismutase; SOD) dengan menurunkan penanda tekanan oksidatif; aras plasma malondialdehid (MDA) tikus pascamenopaus yang diberi diet kolesterol diperkaya dengan HPO.
- c. Profil metabolik aorta tikus pascamenopaus yang diberi diet tinggi lemak diperkaya dengan HPO berubah dengan suplementasi ekstrak etanol *Gynura procumbens*.

## **BAB II**

### **KAJIAN KEPUSTAKAAN**

#### **2.1 MENOPAUS**

Menopaus didefinisikan sebagai keadaan kitaran haid yang terhenti selama setahun berturut-turut. Keadaan ini juga dikenali sebagai putus haid. Wanita yang menghampiri fasa menopaus bermula dengan keadaan kitaran haid yang tidak konsisten, jumlah pendarahan haid yang sedikit, kelewatan kitaran haid melebihi dua minggu dan akhirnya haid terhenti secara kekal. Menopaus berlaku disebabkan proses penuaan dan juga penurunan pengeluaran hormon reproduktif iaitu estrogen dan progesteron oleh ovari diikuti dengan kenaikan hormon gonadotropin iaitu hormon perangsang folikel (FSH) dan hormon luteinan (LH) (Mancini et al 2013).

Beberapa kajian lepas menunjukkan bahawa estrogen mempunyai kesan pelindung terhadap penyakit kardiovaskular (Baker et al. 2003; Deroo & Korach 2006). Kajian oleh Jokela et al. (2004) mendapati bahawa aras kolesterol jumlah dan lipoprotein berketumpatan rendah (LDL) serum lebih tinggi pada wanita pascamenopaus berbanding wanita pramenopaus, sekaligus meningkatkan risiko aterosklerosis. Mereka juga mendapati bahawa terdapat kolerasi positif di antara faktor umur dengan aras kolesterol jumlah dan LDL dalam serum. Penemuan sama juga didapati oleh Zago et al. (2004) yang menunjukkan kepekatan kolesterol jumlah (TC), triasilgliserol jumlah (TG) dan LDL serum adalah lebih tinggi pada wanita pascamenopaus berbanding wanita pramenopaus. Sebaliknya, kepekatan lipoprotein berketumpatan tinggi (HDL) serum pada wanita pascamenopaus pula adalah rendah secara signifikan berbanding wanita pramenopaus. Kajian lepas juga melaporkan bahawa penuaan, disfungsi endotelium dan pengumpulan lemak viseral yang berlebihan menyumbang kepada penyakit kardiovaskular subklinikal semasa peralihan

premenopaus kepada menopaus (Cabrera-Rego et al. 2018). Hasil kajian tersebut mendapati bahawa ketebalan kekakuan arteri karotid akibat kekurangan estrogen meningkat selepas wanita mengalami menopaus menyebabkan inflamasi, vasokonstriksi dan peningkatan kebolehtelapan vaskular yang boleh menyumbang kepada perkembangan aterosklerosis.

## **2.2 ATEROSKLEROSIS**

Aterosklerosis adalah penyakit inflamasi kronik yang disebabkan oleh pengerasan pada arteri yang menyebabkan penyempitan dinding pembuluh darah (Mitchell & Schoen 2010). Pengerasan pada arteri berlaku disebabkan oleh pengumpulan lemak dan kolesterol yang akhirnya menyebabkan pembentukan plak aterosklerotik (Patel et al. 2016). Pembentukan plak aterosklerotik berpunca daripada pendepositan LDL yang berlebihan yang terkumpul di lapisan intima diikuti dengan proses pengoksidaan dan pengubahsuaian lipid sehingga membentuk LDL teroksidasi (oxLDL) (Jay 2017). Plak aterosklerosis yang terbentuk pada arteri kenyal dan berotot dipanggil sebagai aterosklerosis, manakala pada arteri kecil dan arteriol (Saçlı et al. 2018) dipanggil sebagai arteriolosklerosis (Ighodaro et al. 2017).

### **2.2.1 Jenis-jenis Arteri**

Arteri terbahagi kepada tiga jenis berdasarkan struktur dan saiz. Arteri besar atau kenyal iaitu aorta yang mempunyai cabang-cabang besar aorta terdiri daripada subklavian, karotid dan iliak serta arteri pulmonari. Manakala arteri sederhana atau berotot yang merupakan cabang-cabang aorta terdiri daripada arteri koronari dan arteri ginjal. Arteri kecil dan arteriol pula terletak di dalam tisu dan organ (Milutinović et al. 2020).

Secara umumnya dinding aorta bersifat kenyal dan dindingnya terdiri daripada tiga lapisan iaitu tunika media (TM), tunika intima (TI) dan tunika adventisia (TA). Intima adalah lapisan yang paling dalam yang melapisi lumen. Manakala lapisan kedua yang lebih tebal adalah media dan lapisan paling luar adalah adventitia. Ketiga-tiga lapisan ini dibahagikan oleh membran kenyal, iaitu lamina elastik dalaman (IEL).

Tunika intima merupakan lapisan paling dalam dinding pembuluh darah. Lapisan ini terdiri dari satu lapisan sel endotelium serta sedikit tisu penghubung subendotelium (kolagen, laminin, fibronektin, dan molekul matriks ekstrasel) dan lapisan asas tisu elastik dalaman. Lapisan elastik dalaman ini memisahkan tunika intima daripada tunika media (Fu et al. 2017). Sel endotelium berbentuk leper dan poligon serta memanjang mengikut arah pengaliran darah. Ia merupakan lanjutan dari lapisan endokardium jantung dan membentuk permukaan licin yang meminimumkan geseran ketika peredaran darah melalui lumen.

Sel endotelium mengandungi faktor pembeku darah iaitu faktor *von Willebrand*. Sel endotelium adalah penting bagi homeostasis dinding salur darah dan peredaran darah yang normal, membentuk halangan fizikal antara aliran darah dan dinding arteri (Krüger-Genge et al. 2019) yang bersifat separa telap serta mengawal pergerakan molekul kecil dan besar ke dalam dinding salur darah. Ia juga mengawal pelbagai proses lain seperti tindak balas imun dan inflamasi serta pertumbuhan sel-sel lain terutamanya sel otot licin (Basatemur et al. 2019). Ia diaktifkan oleh tekanan hemodinamik dan produk lipid yang penting dalam patogenesis aterosklerosis. Sel endotelium yang telah aktif merembeskan molekul-molekul pelekatan dan menghasilkan sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan, prokoagulan dan antikoagulan (Jamwal & Sharma 2018).

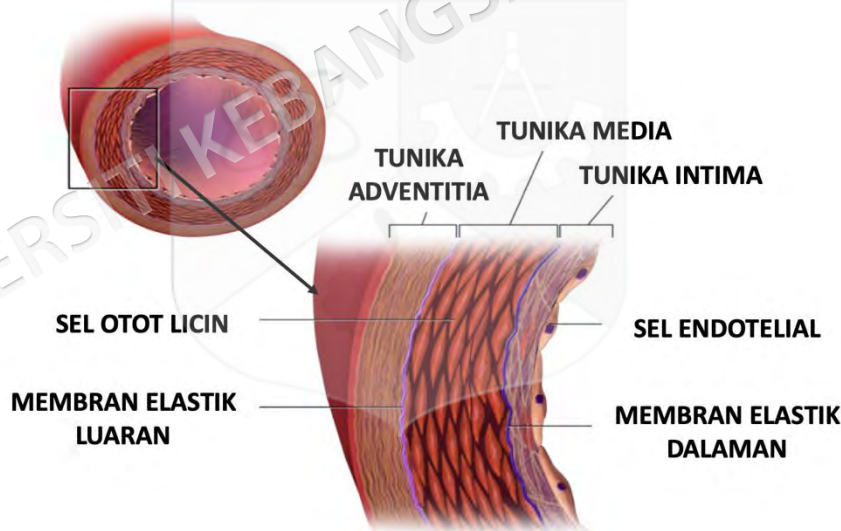
Tunika media terdiri daripada sel otot licin yang tersusun secara berlapis dengan lapisan sel otot licin vaskular (VSMCs) dan matrik ekstrasel yang kaya elastin. Matrik ekstrasel seperti serat elastik dan kolagen serta sedikit proteoglikan menampung susunan sel otot licin tersebut. Bilangan serat kenyal yang banyak diperlukan bagi arteri untuk proses vasodilatasi dan vasokonstriksi (Zaromitidou et al. 2016). Apabila penuaan berlaku, aorta menjadi kurang elastik dan salur darah besar kurang mengembang terutamanya apabila tekanan darah meningkat.

Sel ini juga mensintesis kolagen, elastin dan proteoglikan serta merembeskan faktor pertumbuhan dan sitokin (Wojta 2019). Sel otot licin bermigrasi ke tunika media dan berproliferasi apabila terjadi kecederaan pada salur darah. Aktiviti migrasi dan proliferasi sel otot licin dikawal oleh protein penggalak seperti faktor pertumbuhan

cetusan platelet (PDGF) dan interleukin-1 (IL-1) serta perencat seperti nitrik oksida (NO) dan faktor pertumbuhan transformasi-beta (TGF- $\beta$ ).

Sel otot licin menyerap oksigen dan nutrien melalui lumen yang dibantu oleh ruang-ruang di lamina elastik dalaman. Namun, oksigen dan nutrien yang diserap tidak sampai kepada sel-sel otot licin berhampiran dengan tunika adventitia di dalam arteri sederhana dan besar.

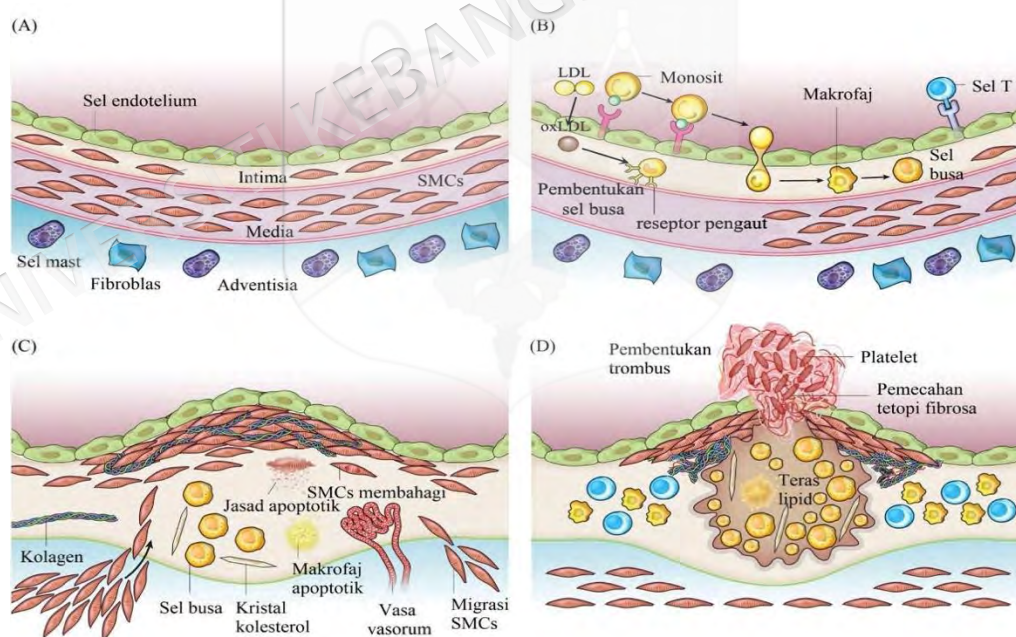
Tunika adventisia terdiri daripada tisu penghubung, serat saraf dan vasa vasorum. Ia terdiri daripada elastin, sel otot licin, fibroblas dan kolagen. Adventitia memainkan peranan penting dalam mengawal pembentukan semula salur darah dan bioaktiviti NO. Ia juga terlibat dalam pembentukan penyakit berkait kardiovaskular seperti aterosklerosis dan hipertensi (Milutinović et al. 2020). Rajah 2.1 menunjukkan struktur keratan rentas arteri.



Rajah 2.1 Struktur Keratan Rentas Arteri

## 2.2.2 Mekanisme Pembentukan Aterosklerosis

Sel endotelium, leukosit dan sel otot licin intima merupakan faktor utama pembentukan plak aterosklerosis yang melibatkan pengoksidaan lipoprotein dan inflamasi. Aterosklerosis berlaku pada lapisan dalam arteri yang dimulai dengan ketidakfungsian dan pengaktifan sel endotelium (Gimbrone Jr & García-Cardena 2016). Ketidakfungsian endotelium dikaitkan dengan pembentukan awal plak aterosklerosis dan dicirikan melalui penurunan bioavalibiliti NO. Semua faktor risiko kardiovaskular termasuk aterosklerosis, dislipidemia, hipertensi, hiperglisemia dan diabetes dikaitkan dengan ketidakfungsian endotelium serta oxLDL, renin-angiotensin dan ketahanan insulin. Peningkatan pengekspresan molekul lekatan dan sitokin proinflamasi membawa kepada vasodilatasi bergantung kepada endotelium yang tidak normal. Keadaan ini menyebabkan pembentukan plak ateroma atau plak aterosklerosis. Apabila plak semakin besar, pemecahan plak berlaku dan menyebabkan serangan jantung. Rajah 2.2 menunjukkan mekanisme pembentukan aterosklerosis.



Rajah 2.2 Mekanisme Pembentukan Aterosklerosis

Sel endotelium berfungsi untuk mengekalkan fungsi salur darah dan aliran darah dalam saluran arteri. Dalam keadaan normal homeostasis, sel endotelium mencegah

perlekatan sel darah putih dan pengekspresan faktor proinflamasi yang berlebihan (Cai et al. 2018). Namun, faktor risiko daripada persekitaran seperti hiperkolesterolemia, hipertensi, aras gula yang tinggi, asap rokok dan faktor genetik mempengaruhi perubahan fungsi endotelium (Jamwal & Sharma 2018). Faktor risiko ini disebabkan oleh peningkatan penghasilan spesies oksigen reaktif (ROS) seperti anion superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil (Hsieh & Zepp 2019). Penghasilan ROS yang berlebihan menyebabkan tekanan oksidatif iaitu ketidakseimbangan aras ROS dan pertahanan antioksidan dan menyebabkan kecederaan pada endotelium dan seterusnya menjadi penyumbang utama kepada aterogenesis (Poljsak et al. 2013).

Tekanan oksidatif yang mengubah transduksi isyarat endotelium salur darah dengan meningkatkan ketelapan dan menggalakkan perlekatan leukosit (Lum & Roebuck 2001). ROS seperti peroksinitrot, radikal oksigen dan hidrogen peroksida boleh memecahkan tetrahidrobiopterin (BH4) iaitu kofaktor utama bagi nitrik oksida sintase endotelium (eNOS). Proses degradasi ini boleh merencat aktiviti eNOS yang merupakan enzim yang menghasilkan nitrik oksida. Nitrik oksida merupakan oksidan penting yang dihasilkan oleh sel endotelium dan makrofaj. Ia boleh menjadi anti-aterogenik dan pro-aterogenik. NO yang dihasilkan oleh eNOS memainkan peranan penting dalam vasodilatasi, penjana semula sel endotelium, perencatan penglibatan leukosit dan perlekatan platelet. Ini mencegah daripada terjadinya aterosklerosis. Sebaliknya, jika makrofaj menghasilkan lebih banyak nitrik oksida, ia boleh mengaruh pembentukan aterosklerosis (Koelwyn et al. 2018). Selain itu, ROS yang berlebihan sangat cepat bertindak balas dengan NO dan menghasilkan peroksinitrat teroksida yang sangat reaktif. Tindak balas ini mengurangkan aras NO yang tersedia ada seterusnya merosakkan proses vasorelaksasi (Spahis et al. 2017).

Peningkatan ketelapan sel endotelium membolehkan molekul lipid terutamanya LDL menyusup masuk ke dalam dinding arteri (Chen et al. 2020b). ROS yang berlebihan juga membantu proses ubahsuaian oksidatif terhadap LDL. Asid lemak yang tak tepu dalam kolestril ester, fosfolipid dan triasilgliserol juga terdedah kepada oksidasi daripada ROS dan menghasilkan fragmen yang lebih kecil termasuklah aldehida dan keton yang akan bergabung dengan amino lipid atau apoB. Fragmen-fragmen tersebut kemudiannya bergabung dan seterusnya memburukkan lagi plak

aterosklerosis. Pengambilan LDL teroksidasi oleh reseptor makrofaj membentuk sel-sel busa lipid laden dan jalur lemak pada dinding arteri. Ini merupakan langkah awal pembentukan plak aterosklerosis (Sukhorukov et al. 2020).

Penghasilan oxLDL dan asid lemak bebas boleh mengaruh inflamasi. Apabila berlakunya kerosakan fungsi sel endotelium, oxLDL menyerang dinding arteri dan berkumpul dalam intima. OxLDL dan stimuli inflamasi mengaktifkan pengekspresan molekul perlekatan terutamanya molekul lekatan-1 vaskular (VCAM-1), molekul lekatan intersel-1 (ICAM-1), selektin E dan selektin P. Molekul perlekatan ini dibawa oleh darah ke luka yang disebabkan oleh aterosklerosis (Zhong et al. 2018). Selain itu, molekul migrasi transendotelium seperti sitokin pengkemotarik juga diekspreskan untuk mempercepatkan migrasi ke lesi. Protein kemotaktik monosit-1 (MCP-1) yang dihasilkan sel endotelium, sel otot licin dan makrofaj merupakan kemokin dan reseptor kepada monosit/makrofaj (CCR2) yang dihasilkan semasa pembentukan plak. MCP-1 kemudian menarik sel T dan monosit. Sitokin seperti IL-8 juga membantu aterogenesis dalam proses pengisyaratan monosit-makrofaj (Wang et al. 2019).

Selain itu, sel imun yang teraktif juga mengaruh penghasilan interleukin- 6 (IL-6) yang seterusnya merangsang penghasilan komponen tindak balas fasa akut termasuklah protein reaktif C (CRP), serum amiloid A dan fibrinogen (Tanaka et al. 2018). Penemuan faktor berisiko penyakit berkaitan aterosklerosis telah dipastikan sebagai penanda inflamasi seperti CRP, penanda protrombik dan fibrinogen (Yu et al. 2017). Aras protein reaktif C kesensitifan tinggi (hCRP) yang meningkat merupakan faktor risiko yang penting bagi pembentukan aterosklerosis dan penyakit arteri koronari (Koenig 2013). Dalam intima, sel monosit berubah kepada sel makrofaj melalui proses pembezaan dan seterusnya melingkungi lipoprotein yang bersifat aterogenik melalui reseptor pemangsa iaitu SR-A dan CD36 untuk membentuk sel busa iaitu makrofaj yang dipenuhi kolesteril ester. Proses ini berterusan dengan adanya lipoprotein aterogenik. Semasa perkembangan aterosklerosis, sel endotelium, makrofaj dan sel otot licin mati melalui apoptosis dan nekrosis. Ini menyumbang kepada pembentukan teras lipid yang lembut dan tidak stabil dalam plak (Libby 2012). Apoptosis juga menyumbang kepada peningkatan aktiviti faktor tisu dan proses trombosis teras lipid dalam plak (Badimon & Vilahur 2014). Plak aterosklerosis boleh mengeras melalui proses kalsifikasi dengan

peningkatan umur (Wang et al. 2018). Walau bagaimanapun, terdapat juga plak yang kurang terkalsifikasi menyebabkan sindrom koronari akut akibat trombosis koronari.

Trombosis koronari merupakan penyebab utama kepada kematian kardiak secara mengejut, infarksi miokardium akut dan angina yang tidak stabil (Montone et al. 2018). Sebanyak 76% daripada kes kematian serangan jantung di seluruh dunia adalah disebabkan pemecahan plak (Bentzon et al. 2014). Pembentukan trombus dan gangguan pada plak disebabkan oleh penghasilan sel-sel inflamasi yang berlebihan. Sekiranya saiz trombi yang terhasil adalah kecil, trombi tersebut bergabung untuk membentuk plak aterosklerosis, sebaliknya, jika saiz trombi adalah besar, ia akan menyumbang kepada sindrom koronari akut. Pemecahan plak selalu berlaku pada tetopi fiber nipis yang mengandungi kolagen dan sel otot licin yang sedikit tetapi mempunyai jumlah sel makrofaj yang banyak.

Pengaktifan makrofaj dan sel mastosit mengakibatkan pengeluaran metalloproteinases dan sisteina proteases yang mendegradasi kolagen dan menghasilkan perantara dalam mengaruh kematian sel otot licin yang merupakan sumber pembentukan kolagen dalam arteri (Libby 2012). Sel makrofaj dan mastosit ini juga boleh menghasilkan protrombik dan faktor penggumpalan seperti faktor IV yang seterusnya mengaktifkan faktor IX dan X. Kolagen yang terdedah dalam intima kemudiannya mengikat kepada faktor von Willbrand dan mengaktifkan platelet untuk melekat kepada reseptor permukaan kompleks platelet glikoprotein Ib/V/IX dalam keadaan tekanan ricih yang tinggi. Pengaktifan platelet ini menghasilkan perencat pengaktif plasminogen (PAI-1) yang seterusnya merencat mekanisme fibrinolitik iaitu proses yang mendegradasi fibrin (Vilahur et al. 2017). Proses ini boleh melemahkan tetopi fiber plak ateroma yang kemudiannya menyumbang kepada pemecahan plak. Aras CRP dan IL-6 yang tinggi dalam angina yang tak stabil dan infarksi miokardium juga menunjukkan peranan inflamasi dalam pembentukan aterosklerosis (Li et al. 2020).

LDL teroksida memaikan peranan penting dalam patogenesis aterosklerosis (Pirillo et al. 2013). Malah, beberapa kajian telah membuktikan kewujudan oxLDL di dalam plak ateroaklerosis melalui kajian imunohistokimia (Rasbach et al. 2019).

Walaupun terdapat beberapa kajian lain yang mengukur aras oxLDL di dalam plasma, sirkulasi darah adalah tempat yang kurang sesuai bagi LDL untuk mengalami pengoksidaan kerana kehadiran antioksidan yang banyak di sana. Jadi, kehadiran oxLDL di dalam plasma mungkin disebabkan oleh pembebasan oxLDL daripada lesi aterosklerosis ke sirkulasi akibat plak yang telah pecah. Aras oxLDL di dalam plasma yang diukur besar kemungkinan adalah sangat sedikit berbanding arasnya di dalam plak aterosklerosis (Trpkovic et al. 2015).

Pengoksidaan LDL bermula apabila LDL dari sirkulasi memasuki lapisan tunika intima. Kandungan LDL yang tinggi dalam plasma meningkatkan kadar kemasukan LDL ke dalam dinding arteri. Keadaan dinding arteri yang kurang antioksidan menjadikan LDL lebih sensitif dan mudah mengalami pengoksidaan (Summerhill et al. 2019). Molekul-molekul seperti radikal peroksi, nitrik oksida dan ion logam (ferum, kuprum) mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan yang boleh bertindak dengan radikal lain atau molekul bukan bahan radikal untuk menghasilkan satu molekul radikal yang baru. Jika radikal bebas ini bertindak dengan lipid, ia mewujudkan satu rantai proses yang akhirnya menyebabkan peroksidasi lipid (Abd El 2012).

Partikel LDL mempunyai teras yang kaya dengan kolesteril ester dan permukaan yang penuh dengan kolesteril bebas seperti fosfolipid yang membentuk "*minimally modified oxLDL*" (MM-LDL). Ketika ini, apoB-100 masih tidak berubah dan dapat dikesan oleh reseptor LDL. Proses pengoksidaan seterusnya berlaku apabila asid lemak tepu (PUFA) pada partikel LDL dioksidakan kepada lipid hidroperoksida dan kemudiannya membentuk aldehid yang reaktif. Ini akan mengubah apoB-100 dan menyebabkan partikel LDL lebih bercas negatif membentuk oxLDL. Reseptor LDL mempunyai afiniti yang rendah terhadap oxLDL tetapi meningkatkan afiniti pemangsa (Sawada et al. 2020). Reseptor pemusnah oxLDL serupa-leptin atau LOX-1 mempunyai afiniti yang tinggi terhadap oxLDL dan boleh menghasilkan lebih banyak ROS menyebabkan berlakunya mekanisme tindak balas positif kepada oksidasi LDL. Spesis oksigen reaktif tersebut juga boleh menggalakkan pengaktifan faktor nuklear  $\kappa\beta$  yang mengawal ekspresi gen faktor nekrosis tumor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) serta menyebabkan ketidakfungsian endotelium dengan mengurangkan kepekatan nitrik oksida yang bertanggungjawab sebagai vasodilator (Lingappan 2018). Tindak balas inflamasi turut

terlibat di dalam patogenesis aterosklerosis yaitu MM-LDL menyebabkan pengaktifan sel endotelium untuk mengekspresikan protein kemotaktik monosit-1 (MCP-1) dan faktor penggalak koloni mikrofaj (M-CSF). MCP-1 merangsang kemasukan sel-sel monosit ke dalam dinding arteri (Rong et al. 2002). Sel-sel monosit akan meningkatkan penghasilan matriks metaloproteinase monosit-9 (MMP-9) yang menggalakkan kemasukan leukosit ke dalam lapisan endotelium dan intima dan seterusnya monosit berubah ke makrofaj di bawah tindakan M-CSF (Zimmermann et al. 2012).

Partikel oxLDL pula menyebabkan ekspresi molekul-molekul perlekitan oleh sel endotelium seperti VCAM-1 dan ICAM-1. Molekul-molekul ini akan memudahkan perlekitan sel-sel mononuklear dengan endotelium serta membantu sel-sel bermigrasi ke dalam ruang subendotelium (Takei et al. 2001). Ketika ini juga sel otot licin akan menghasilkan IL-6 yang menyebabkan tindak balas fasa akut yang berlaku di hepar untuk menghasilkan CRP, fibrinogen dan penghenti pengaktifan plasminogen-1 (PAI-1) (Rubio-Jurado et al. 2012). CRP akan merangsang ekspresi molekul-molekul perlekitan, mengekspresikan IL-8 yang juga menggalakkan tindak balas inflamasi oleh TNF- $\alpha$  dan IL-1 yang meningkatkan oksidasi lipid (Rocha et al. 2017).

Reseptor pemangsa (CD36 dan SR-A) yang terdapat pada mikrofaj akan mengambil oxLDL secara endositosis. Tidak seperti reseptor LDL yang mempunyai mekanisme maklum balas perencatan, kandungan kolesterol yang tinggi tidak akan menghentikan aktiviti reseptor pemangsa. Sebaliknya, mikrofaj akan terus menerus mengambil partikel-partikel oxLDL. Pengumpulan kolesteril ester di dalam sitoplasma menyebabkan mikrofaj berubah menjadi sel busa yang merupakan sel dominan dalam lesi aterosklerosis awal iaitu jalur lemak (Sukhorukov et al. 2020). Mikrofaj terus berproliferasi dan meningkatkan tindak balas inflamasi dengan merembeskan pelbagai faktor pertumbuhan dan sitokin, seperti TNF- $\alpha$  dan interleukin 1 $\beta$ . Sel T-limfosit yang turut memasuki lapisan intima tertakrif dan merembeskan interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Sel T juga mengekspresikan CD40L yang akan bercantum dengan reseptor CD40 pada mikrofaj dan seterusnya menggalakkan progresi pembentukan plak aterosklerosis (Michel et al. 2017). Kemasukan tisu serat akan membentuk lesi lanjut aterosklerosis. Mikrofaj aktif dan sel endotelium merembeskan PDGF akan menyebabkan sel-sel otot licin bermigrasi dari lapisan media ke intima. Di dalam intima, sel otot licin

berproliferasi dan merembeskan protein matrik ekstrasel seperti kolagen. Proses ini menyebabkan lesi aterosklerosis berubah daripada plak yang kaya dengan lipid kepada plak berserat dan seterusnya plak berkalsium yang boleh menyebabkan stenosis (Zmysłowski & Szterk 2017).

### 2.2.3 Faktor Risiko Aterosklerosis

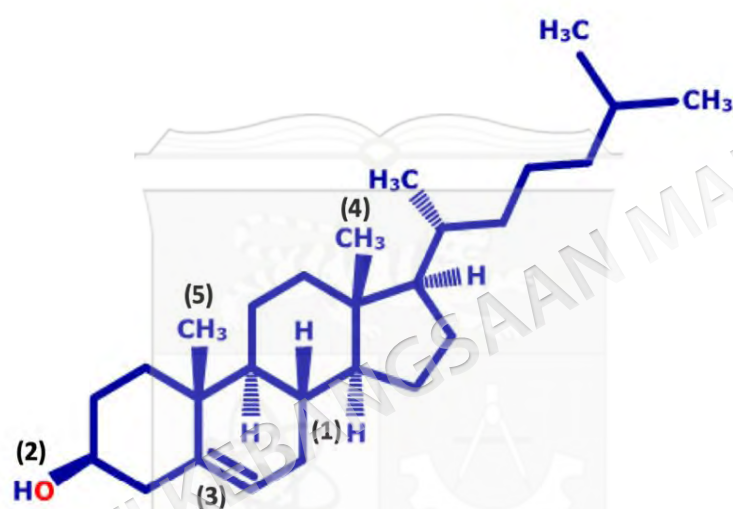
Faktor risiko boleh didefinisikan sebagai ciri-ciri biologi yang boleh diukur pada individu yang boleh mengaruh pembentukan penyakit dan faktor yang berkait secara langsung dengan tapak jalan biologi. Manakala penanda biologi pula merupakan penunjuk biologi yang terlibat dalam pembentukan penyakit. Perbezaan antara faktor risiko dan penanda biologi adalah tidak ketara (Trajanoska et al. 2018). Walau bagaimanapun, penanda biologi juga boleh menjadi faktor risiko sekiranya menjadi penyebab kepada penyakit (Packard & Libby 2008).

Penyakit aterosklerosis merupakan pelbagai faktor yang dipengaruhi oleh faktor genetik dan persekitaran. Beberapa kajian dilakukan dalam penentuan risiko kardiovaskular untuk tujuan pengesanan dan pencegahan awal bagi individu yang berisiko untuk mendapat aterosklerosis (Faggiano et al. 2019). Antaranya ialah kajian daripada Framingham yang diubahsuai oleh Program Pendidikan Kolesterol Kebangsaan Amerika Syarikat (Pérez-Guerrero et al. 2000) adalah berdasarkan faktor risiko tradisional iaitu umur, jantina, kolesterol total, kolesterol lipoprotein berketumpatan rendah (LDL), kolesterol lipoprotein berketumpatan tinggi (HDL), tekanan darah sistolik dan merokok (Detection & Adults 2002). Manakala kajian lain daripada *Prospective Cardiovascular Münster* (PROCAM) menyatakan terdapat lapan pembolehubah risiko yang telah dikenalpasti iaitu umur, merokok, kolesterol LDL, kolesterol HDL, tekanan darah sistolik, sejarah keluarga yang mempunyai infarksi miokardium (MI) pramatang, diabetes mellitus dan triasilgliserol (Assmann et al. 2005).

## 2.3 PENANDA BIOLOGI ATEROSKLEROSIS

Salah satu risiko yang menyumbang kepada pembentukan arterosklerosis ialah kandungan kolesterol dalam badan. Kolesterol merupakan sebatian yang mempunyai struktur nukleus perhidrosiklopentenofenantrina dengan empat cincin yang bersambung

(1) satu kumpulan hidroksil tunggal, (2) bahagian tengah yang tidak tepu, (3) rantai hidrokarbon, (4) dan (5) kumpulan metil seperti dalam Rajah 2.3. Kolesterol merupakan komponen yang penting dalam sel membran mamalia (Krause & Regen 2014). Kepekatan plasma kolesterol individu sihat adalah antara 150 hingga 200 mg/dL. Kepekatan kolesterol yang tinggi dalam darah manusia mungkin disebabkan plasma lipoprotein seperti lipoprotein ketumpatan rendah (LDL) dan lipoprotein ketumpatan tinggi (HDL) yang mempunyai struktur kolesterol.



Rajah 2.3 Struktur Kolesterol

Peningkatan aras LDL disebabkan pembentukan aterosklerosis dimana kolesterol dihantar kepada makrofaj yang terdapat dalam dinding arteri. Sebaliknya, peningkatan aras apoA-1 iaitu komponen utama HDL dapat mengaruh proses pengangkutan kolesterol berbalik makrofaj sekaligus mencegah daripada berlakunya aterosklerosis (Zhang et al. 2003). HDL boleh menghalang atau memusnahkan pembentukan LDL teroksida yang bertanggungjawab dalam permulaan proses pembentukan ateroma (Watson et al 1995). Kapasiti efluks oleh kolesterol HDL berkait secara negatif dengan kehadiran aterosklerosis (Khera et al. 2011). Efluks kolesterol adalah langkah pertama dalam proses pengangkutan kolesterol berbalik yang dijalankan oleh HDL. Lipoprotein berketumpatan tinggi menghantar lebih kolesterol dalam tisu periferil ke hati untuk perkumuhan dalam hempedu (Rader et al. 2009). Kajian lain juga

mencadangkan bahawa HDL mempunyai peranan penting dalam kolesterol berbalik makrofaj dan dapat melindungi daripada pembentukan aterosklerosis (El Harchaoui et al. 2009; Vergeer et al. 2010). Oleh itu, penurunan aras HDL sering dikaitkan dengan peningkatan risiko mendapat aterosklerosis (Navab et al 2009).

Selain itu, triasilgliserol juga memainkan peranan dalam menyumbang kepada pembentukan aterosklerosis. Kajian mendapati hipertriasilgliserol merupakan faktor risiko tak bersandar untuk penyakit kardiovaskular (Talayero & Sacks 2011; Miller et al. 2011). Garis panduan daripada Adult Treatment Panel III (ATP III) menggariskan titik pisah bagi bacaan normal triasilgliserol adalah di bawah 150 mg/dL atau 1.7 mmol/L (The Expert Panel 2002). Peningkatan aras triasilgliserol dan penghasilan asid lemak bebas dalam pesakit sindrom metabolik menyumbang kepada pengumpulan dan perembesan lipoprotein berketumpatan sangat rendah (vLDL). Penghasilan triasilgliserol yang diperkaya dengan partikel LDL terjadi melalui pertukaran komponen kolesterol ester antara vLDL dan LDL. Triasilgliserol yang diperkaya dengan partikel LDL seterusnya menjalani proses lipolisis untuk memecahkan partikel menjadi semakin kecil dan tumpat (Kwiterovich 2002; Nicholls & Lundman 2004). Partikel yang kecil dan tumpat ini lebih mudah untuk menembusi dinding arteri dan lebih cenderung untuk dimodifikasi oleh ROS seterusnya membantu pembentukan plak dalam arteri (Lamarche et al 2008).

Protein reaktif C (CRP) adalah protein fasa akut yang terdiri daripada lima subunit 21.5 kDa yang sama. Semasa pemisahan struktur pentameriknya, subunit CRP mengalami perubahan konformasi yang spontan dan tidak berbalik (Diehl et al. 2000). Sebahagian besar CRP yang terdapat dalam plasma adalah daripada hati di mana sintesis CRP diatur oleh tindakbalas interleukin (Norata et al. 2009). Interleukin-6 (IL6) merupakan salah satu pemacu utama penghasilan CRP yang dihasilkan daripada pengaktifan leukosit. Pengaktifan leukosit pula adalah tindak balas terhadap jangkitan atau trauma yang terjadi dalam sel otot licin salur darah hasil daripada pembentukan aterosklerosis (Yousuf et al. 2013). Terkini, penggunaan hsCRP sebagai penanda inflamasi bersama risiko kardiovaskular lain masih lagi sesuai digunakan dalam bidang perubatan untuk menentukan keputusan perubatan bagi pesakit (Windgassen et al. 2015).

CRP merupakan salah satu bahan yang wujud dalam lesi aterosklerotik terutamanya di tunika intima. Di kawasan ini, penempatan CRP berlaku bersama dengan monosit, makrofaj dan lipoprotein (Torzewski et al. 1998; Zwaka et al. 2001). CRP menaikkawal molekul pelekatan dan kemokin pengkemotarik seperti MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 dan selektin E dalam sel endotelium dan sel otot licin salur darah sel monosit seterusnya mengaruh pelekatan platlet kepada sel endotelium (Pasceri et al. 2000; Yaron et al. 2006). CRP juga merangsang disfungsi sel endotelium dan penempatan monosit dan limfosit-T kepada dinding endotelium. Penghasilan endotelin-1 iaitu faktor vasoaktif terbitan endotelium dan sitokin inflamasi seperti interlukin-6 dan interlukin-8 juga menjadi perantara peningkatan pengekspresan molekul pelekatan (Paffen et al. 2006). Selain itu, CRP juga mengaktifkan tapak jalan pengisyaratan NF- $\kappa$ B sel endotelium dalam sel otot licin.

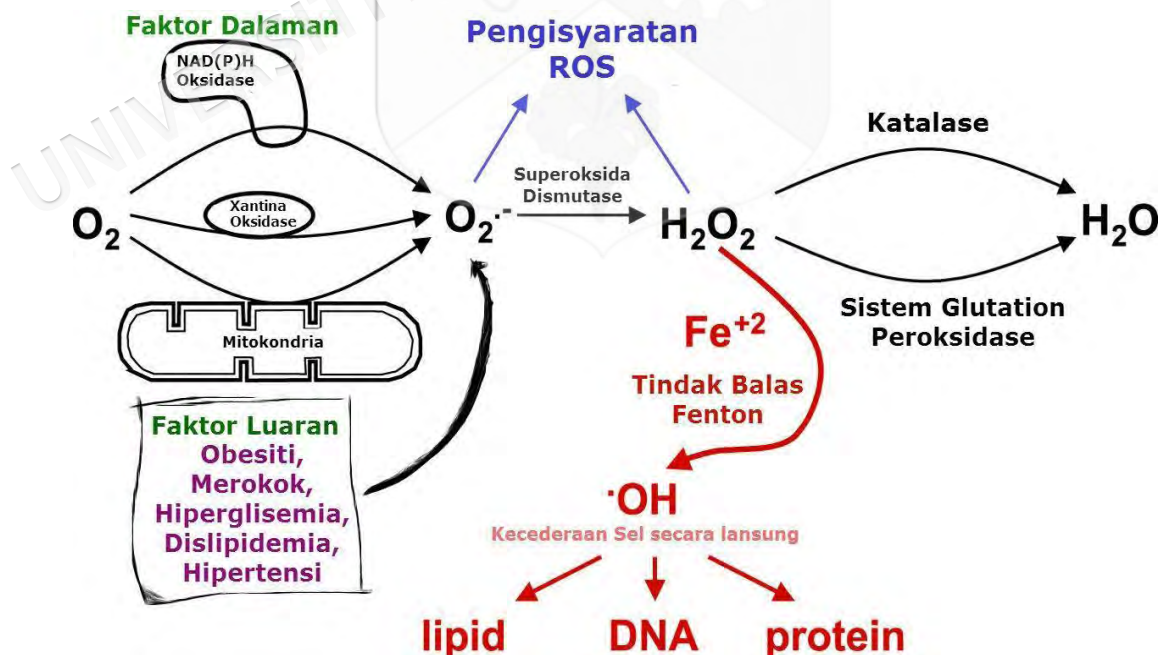
CRP boleh menurunkan pengekspresan dan aktiviti biologi atau NOS3 melalui pengikatan reseptor CRP Fc $\gamma$ IIa yang menjejaskan proses penvasokembangan (Venugopal et al. 2003; Escribano-Burgos et al. 2005). CRP juga terlibat dalam pelepasan MCP-1 daripada makrofaj akibat daripada LDL yang telah terdegradasi (Klouche et al. 1998). Hal ini berlaku kerana lipid juga berinteraksi dengan CRP yang memungkinkan pemendapan lipoprotein dan pengaktifan komplemen dalam plak aterosklerotik dengan mengikat kolesterol LDL yang telah teroksida (Libby 2002).

Spesis oksigen reaktif (ROS) dihasilkan oleh organisme hidup daripada metabolisme sel yang normal. ROS dihasilkan melalui respirasi sel, oksidasi NADPH, enzim xantina oksida dan melalui rantai pengangkutan elektron (Lushchak 2014). Jenis ROS yang banyak terjadi dalam fisiologi organisme seperti Jadual 2.1 (Brieger et al. 2012). Anion peroksida terjadi melalui penambahan satu elektron kepada molekul oksigen (Miller et al. 1990). Proses ini dibantu oleh nikotin adenina dinukleotida fosfat [NAD(P)H] oksida atau xantina oksida atau sistem pengangkut elektron (ETC) mitokondria (Faria & Persaud 2017).

Jadual 2.1 Jenis Spesis Oksigen Reaktif

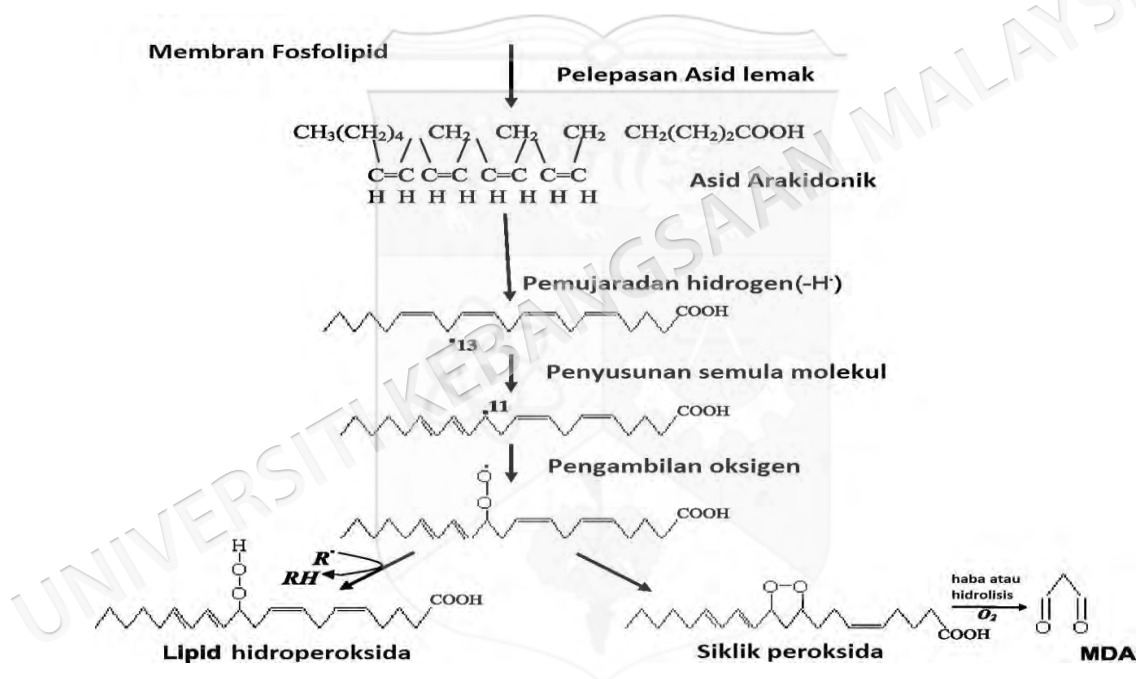
Radikal		Bukan Radikal	
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Superoksida	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrogen peroksida
OH•	Hidroksil	HOCl	Asid hiperklorus
RO <sub>2</sub> •	Peroksil	O <sub>3</sub>	Ozon
RO•	Alkoksil	1O <sub>2</sub>	Oksigen singlet
HO <sub>2</sub> •	Hidroperoksil	ONOO <sup>-</sup>	Peroksinitrit

ROS seperti anion superoksida terhasil terutamanya di dalam mitokondria melalui rantai pengangkut elektrin (ETC). Kebocoran elektron daripada sistem boleh berlaku menyebabkan perlepasan ion radikal terutamanya superoksida (Murphy 2009; Jastroch et al 2010). Selain itu, proses fagositosis juga boleh mengakibatkan penghasilan superoksida melalui NADPH oksida yang terdapat dalam leukosit polimorfonuklear, monosit dan makrofaj. Sel-sel ini akan menghasilkan letupan superoksida untuk membunuh aktiviti bakteria (Robinson 2008). Selain faktor dalaman, faktor luaran seperti obesiti, merokok, dislipidemia, diabetes dan hipertensi juga menyumbang kepada penghasilan ROS (Saxena et al. 2018) (Rajah 2.4). Kepekatan dan pengumpulan ROS yang tidak terkawal boleh menyebabkan kesan buruk iaitu modifikasi komponen sel seperti lipid, protein dan DNA.



Rajah 2.4 Tindak Balas Terhadap Penghasilan ROS

ROS boleh mengaruh peroksidasi lipid dan mengganggu susun atur lipid dwilapisan membran. Ini boleh menyebabkan reseptor membran dan enzim menjadi tidak aktif, dan ketelapan membran meningkat (Di Meo et al. 2016). Peroksidasi lipid memecah dan terurai membentuk aldehyd tereaktif seperti malondialdehyd (MDA) dan produk lipid hidroperoksida seperti dalam Rajah 2.5. Asid lemak politaktepu (PUFA) merupakan komponen paling utama dalam membran sel dan organel yang mudah mengalami peroksidasi lipid (De Oliveira et al. 2017). Peroksidasi lipid PUFA seperti asid arakidonik melalui beberapa tahap yang bermula dengan menyingkirkan satu atom hidrogen daripada rantai sisi karbon metilina oleh radikal hidroksil dan membentuk sebatian karbon, radikal lipid dan air (Yin & Porter 2005).



Rajah 2.5 Sintesis Malondialdehyd Melalui Tapak Jalan Peroksidasi Lipid Terhasil Melalui Tekanan Oksidatif

PUFA mengandungi ikatan ganda dua adalah lebih terdedah kepada proses oksidasi berbanding lemak monotaktepu dan lemak tepu (Vik & Hansen 2018). Sebatian radikal lipid yang mempunyai karbon di tengah mengandungi satu elektron yang tak berpasangan seterusnya menjalani penyusunan semula molekul untuk kestabilan. Radikal lipid menderma satu elektron kepada oksigen untuk membentuk radikal peroksil ( $\text{LOO}\cdot$ ) dan merambat tindak balas rantaian, seterusnya membentuk peroksida siklik dan produk siklik lain seperti malondialdehyd (MDA). Produk-produk

ini boleh menyahaktifkan banyak protein sel dengan membentuk pautan silang protein (Davies 2016).

Aldehid yang kurang hidrofobik seperti MDA, akrolin dan hidroksiheksenal boleh meresap jauh daripada tapak asal pembentukannya. Ini menjadikan molekul ini bertindak sebagai perantara isyarat dalam sel dan tisu mengikut keadaan fisiologi dan patologi individu (Riahi et al. 2010). Mitokondria jantung Dalam penyakit jantung, mitokondria merupakan tapak utama dalam penghasilan produk peroksidasi lipid. Kardiosit yang membentuk otot kardiak dalam jantung mempunyai ketumpatan mitokondria yang paling tinggi jika dibandingkan dengan tisu yang lain. Diet yang tinggi lipid juga menyumbang berlakunya peroksidasi lipid (Cordain et al. 2005). Produk yang terhasil boleh mengubah interaksi di antara lipid-lipid dan lipid-protein dan seterusnya mengganggu fungsi sel dan fungsi mitokondria.

Produk peroksidasi lipid seperti hidroksinonenal mempunyai kereaktifan yang paling tinggi ke atas guanosis. Ini boleh menyebabkan mutasi kepada DNA dan pendedahan yang lama ke atas produk peroksidasi lipid ini boleh meningkatkan pengumpulan kerosakan DNA (Anderson et al. 2012). Banyak kajian mengaitkan peroksidasi lipid iaitu malondialdehid dengan penyakit aterosklerosis.

Kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) merupakan teknik yang diaplikasikan untuk mengukur terbitan MDA menggantikan asai spektrofotometer yang mengesan bahan reaktif asid tiobarbiturik (TBARS) (Pilz et al. 2000). Ini kerana pengesanan TBARS adalah tidak spesifik kepada peroksidasi lipid dan tidak sesuai untuk penentuan peroksidasi lipid dalam sampel darah atau tisu (Tsikas 2017). Kajian dibuat untuk mempertingkatkan kaedah pengukuran MDA menggunakan fasa berbalik HPLC dengan pengesanan UV. Analit diukur selepas bertindak balas dengan 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Pilz et al. 2000).

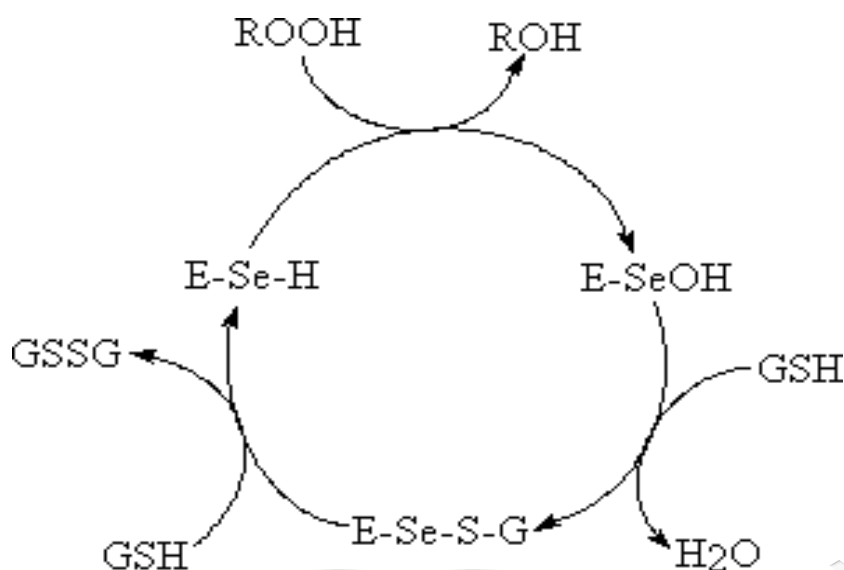
#### **2.4 ANTIOKSIDAN DAN ATEROSKLEROSIS**

Kehadiran radikal bebas dalam sel biasanya diimbangi oleh tindak balas enzim dan unsur antioksidan tambahan di dalam sel. Sel mempunyai sistem pertahanan antioksidan samada secara enzim atau bukan enzim. Superoksida dismutase (SOD),

katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPx) merupakan antioksidan enzim berperanan dalam proses penyahtoksikan radikal bebas.  $H_2O_2$  dinyahtoksikan kepada molekul air dan oksigen oleh enzim antioksidan atau diturunkan kepada radikal hidroksil melalui tindakbalas Fenton (Yi et al. 2019). Molekul bukan enzim pula terdiri daripada unsur antioksidan tambahan yang tidak dihasilkan dalam badan seperti asid askorbik,  $\alpha$ -tokoferol dan vitamin A (Yamada et al. 2020). Radikal bebas yang tidak dinyahtoksikan oleh enzim, memberikan kesan kepada sistem pertahanan sel serta mendorong kepada kerosakan DNA.

Sistem pertahanan antioksidan membantu melawan serangan radikal bebas. Banyak kajian yang mengkaji kaitan tahap aktiviti enzim GPx dengan aterosklerosis. Penurunan aktiviti GPx sangat berkait dengan peningkatan risiko pembentukan penyakit aterosklerosis (Matsuda & Shimomura 2013).

Selenol (ESeH) dalam SecGPx bertindakbalas dengan hidrogen peroksida membentuk asid selenenik (ESeOH) seperti dalam Rajah 2.6. Seterusnya asid selenenik bertindak balas dengan glutathion terturun untuk membentuk aduk selenulsulfida (ESeSG). Glutathion yang kedua pula menjana semula enzim yang aktif dengan menyerang ESeSG untuk membentuk glutathion teroksida (GSSG). Secara keseluruhannya, enzim GPx diturunkan kepada  $-SeH$  kembali oleh 2 molekul GSH untuk membentuk GSSG dan air (Mugesh et al. 2002).



Rajah 2.6 Sistem Glutation Peroksidase

## 2.5 MODEL KAJIAN ATEROSKLEROSIS PASCAMENOPAUS

Kajian menggunakan model haiwan adalah amat penting dalam mengkaji aterosklerosis pascamenopaus serta kaedah rawatan alternatif. Terdapat beberapa kajian dan eksperimen telah dijalankan menggunakan model haiwan untuk memahami mekanisme dan patofisiologi penyakit aterosklerosis.

Diet tinggi lemak telah digunakan dalam kajian terdahulu untuk mengaruhkan keadaan aterosklerosis pada model tikus dewasa Sprague Dawley jantan (Lee et al. 2014; Prabha et al. 2013). Kajian ini menggunakan diet tinggi lemak yang diformulasikan dalam bentuk palet 2% kolesterol yang dicampurkan dengan minyak sawit yang dipanaskan sebanyak lima kali untuk mengaruhkan keadaan aterosklerosis (Ahmad Nazri et al. 2019). Ovariectomi dilakukan untuk menghasilkan model haiwan menopaus kerana hormon estrogen mampu bertindak sebagai ateroprotektif (Naftolin et al. 2019). Disamping keadaan ovariectomi, pemanasan minyak secara berulang kali berupaya meningkatkan risiko aterosklerosis tikus (Adam et al. 2008). Ini disebabkan pemanasan minyak berulang kali meningkatkan kesan tekanan oksidatif dan risiko penyakit aterosklerosis (Jaarin et al. 2006).

Minyak yang dipanaskan berulang kali tetapi tidak secara berterusan (*intermittent*) dikatakan lebih teroksidasi berbanding minyak yang dipanaskan secara berpanjangan tetapi berterusan (*continous*). Hal ini kerana semasa minyak masak menyejuk, oksigen menyerap masuk ke dalam minyak lalu meningkatkan proses autooksidasi (Ghobadi et al. 2018; Totani et al. 2017). Kandungan antioksidan dalam minyak sawit juga terjejas akibat pemanasan berulang kali melalui proses peleraian dan pemeruapan (Choe & Min 2007).

Pemanasan minyak dalam jangka masa panjang pada suhu tinggi (180 °C) menghasilkan radikal bebas seperti radikal hidroksil, radikal alkoksi dan radikal peroksi yang dikenali sebagai spesies oksigen reaktif (ROS) (Choe & Min 2007). Di samping itu, pengambilan makanan yang mengandungi minyak sawit yang dipanaskan berulang kali oleh manusia didapati boleh mengganggu fungsi endotelium dalam pengawalan vasodilasi (Leong et al. 2010; Leong et al. 2009; Ng et al. 2014). Kajian sebelum ini melaporkan bahawa minyak sawit yang dipanaskan berulang kali meningkatkan peroksidasi lipid (Adam et al. 2008) dan inflamasi vaskular (Siti et al. 2019).

Adam et al (2008 & 2009) melaporkan bahawa pengambilan minyak sawit yang dipanaskan berulang kali menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam kandungan malondialdehid (MDA) plasma tikus (Adam et al. 2009; Adam et al. 2008). Penghasilan MDA adalah disebabkan oleh peroksidasi lipid. Kerosakan dan disfungsi makrofaj, otot licin dan sel Endotelium yang menjadi penyumbang kepada aterosklerosis dan hipertensi (Van Hinsbergh 2012).

## **2.6 GYNURA PROCUMBENS (LORR. MER)**

*Gynura procumbens* (Lour.) Merr tergolong dalam keluarga *Compositae* adalah tumbuhan yang terkenal di kalangan masyarakat Malaysia, Indonesia dan Thailand (Keng et al. 2009). Di Malaysia tumbuhan ini tumbuh dengan banyak di bahagian barat Semenanjung Malaysia serta mempunyai beberapa nama sinonim saintifik seperti *Gynura sarmentosa*, DC, *Cacalia procumbens* Lour. dan *Calacia procumbens*, Lour. (Tan et al. 2016). Ia dikenali sebagai pokok sambung nyawa atau akar sebiak dikalangan masyarakat Melayu manakala masyarakat Cina mengenali pokok ini dengan nama feng wei jian (Tan et al. 2016).

*Gynura procumbens* merupakan tumbuhan herba bewarna hijau yang mudah tumbuh sehingga ketinggian 3 meter (Rajah 2.7). Ia tumbuh mengikut musim dan menghasilkan bunga bewarna ungu (Rosidah et al. 2008). Selain mempunyai batang yang berisi lembut, ia juga mempunyai daun yang berbentuk lansolat, iaitu pangkal daun lebih lebar berbanding hujungnya yang lebih runcing dengan ukuran panjang daun antara 2.5 cm hingga 8 cm serta lebar daun sekitar 0.8 cm hingga 3.5 cm (Rahman & Asad 2013). Di Malaysia, daun *Gynura procumbens* dijadikan ulam, manakala di Thailand daun *Gynura procumbens* digunakan sebagai bahan masakan. Ini dibuktikan oleh kajian terdahulu yang melaporkan kebaikan daun *Gynura procumbens* dan selamat untuk dimakan kerana tidak mengandungi kesan toksik (Hamid et al. 2004; Yam et al. 2009). Tumbuhan ini telah digunakan sebagai rawatan tradisional untuk merawat demam, darah tinggi, penyakit buah pinggang, kencing manis, sembelit dan reumatisme (Ashraf 2019).

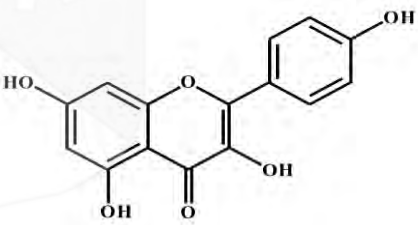
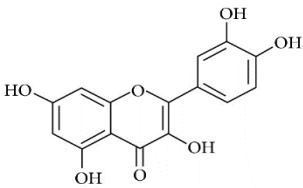
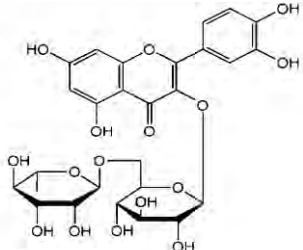


Rajah 2.7 *Gynura Procumbnes*

### 2.6.1 Komposisi *Gynura Procumbens*

Banyak kajian telah dilakukan untuk mengenal pasti potensi perubatan pada ekstrak *Gynura procumbens*. Flavonoid, asid fenolik, dan glikosida telah dikenal pasti sebagai komponen utama dalam ekstrak kasar *Gynura procumbens* yang mempunyai aktiviti antioksidan (Puangpronpitag et al. 2010). Komposisi dan jumlah kandungan fenolik dan flavonoid dalam ekstrak *Gynura procumbens* didapati berbeza-beza bergantung kepada pelarut yang digunakan semasa proses pengekstrakan (Timotius & Rahayu 2020). Kandungan fenolik dan flavanoid yang dikenal pasti dalam ekstrak *Gynura procumbens* termasuk asid klorogenik, asid galik, kaempferol, quercetin, dan rutin (Ahmad Nazri et al. 2019). Selain itu, kajian lain juga turut melaporkan kehadiran sebatian aktif yang lain seperti alkaloid, tanin, triterpenoid, sterol glikosida (Puangpronpitag et al. 2010) dan saponins, steroid (Timotius & Rahayu 2020). Struktur kimia fitokonstituen penting ekstrak *Gynura procumbens* ditunjukkan pada Jadual 2.2. Pelarut yang biasa digunakan semasa pengekstrakan *Gynura procumbens* adalah akueus, metanol, etanol, *n*-butanol dan etil asetat (Algariri et al. 2014).

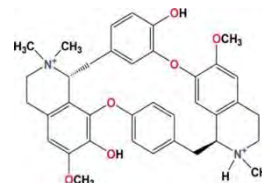
Jadual 2.2 Struktur Kimia Komponen Bioaktif Ekstrak *Gynura procumbens*

Nama sebatian	Struktur kimia
Kaempferol	
Quercetin	
Rutin	

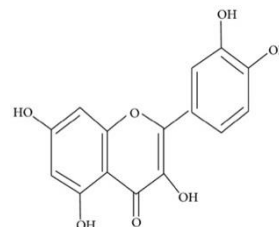
bersambung...

...sambungan

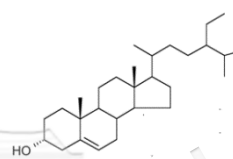
Alkaloid



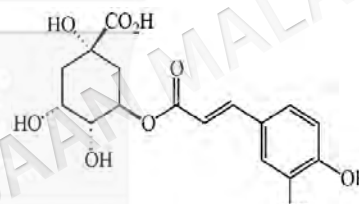
Flovonoid



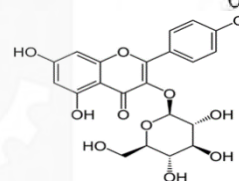
Sterol



Asid Klorogenik



Astragalin



Daun *Gynura procumbens* mengandungi dimer asid klorogenik yang mempunyai aktiviti antioksidan. Kajian oleh Li et al. (2015) ini mendapati asid klorogenik merupakan bahan aktif utama yang terkandung dalam 60% ekstrak etanol *Gynura procumbens* iaitu sebanyak 13.6 % dalam pecahan pengekstrakan. Pengekstrakan etil asetat ekstrak *Gynura procumbens* pula mengandungi tiga polifenol utama iaitu sinarine, asid isoklorogenik A dan asid isoklorogenik C. Semua sebatian ini mempunyai aktiviti anti-pengoksidaan dan anti-inflamasi yang baik (Liu et al. 2019). Dalam kajian lain, pengekstrakan etanol daun *Gynura procumbens* memperolehi dua pecahan sebatian iaitu asid kafeoilquinik dan asid klorogenik. Kedua-dua sebatian ini mempunyai kesan antihiperlipidemik dan mampu menurunkan kolesterol total, triasilgliserol, LDL, indeks aterogenik dan indeks risiko koronari (Murugesu et al. 2017). Namun, hanya pecahan asid kaffeoilquinik yang mampu meningkatkan kolesterol lipoprotein berketumpatan tinggi (Murugesu et al. 2017). Sebatian

kaffeoilquinik menunjukkan kesan yang lebih baik berbanding asid klorogenik. Hasil kajian ini menunjukkan sebahagian daripada asid di-kaffeoilquinik juga menunjukkan sifat anti-hiperlipidemik dan antioksidan. Oleh itu, pecahan kaffeoilquinik berpotensi untuk berkembang menjadi agen farmaseutikal terapi alternatif untuk merawat hiperlipidemia (Murugesu et al. 2017).

Ekstrak etanol daun *Gynura procumbens* juga tertumpu kepada sebatian aktif quercetin. Hasil kajian lepas mendapati bahawa sebatian quercetin dalam ekstrak daun *Gynura procumbens* yang digabungkan dengan ekstrak *Azadirachta indica* menunjukkan kesan hipoglisemik yang lebih baik daripada rawatan dengan *A. indica* atau *Gynura procumbens* sahaja. Gabungan kedua-dua ekstrak tersebut berpotensi sebagai agen penurun glukosa darah (Sunarwidhi et al. 2014).

Kajian terdahulu melaporkan *Gynura procumbens* menunjukkan pelbagai kesan terhadap aktiviti biologi seperti antihiperglisemia (Choi et al. 2016), antikanser (Hew et al. 2013), anti-inflamasi (Jeon & Kwon 2016), anti-gastrik (Mahmood et al. 2010) serta menggalakkan dan memperbaiki fungsi reproduksi (Kamaruzaman et al. 2018).

Eksperimen terdahulu melaporkan kesan ekstrak daun *Gynura procumbens* ketas tikus diabetik aruhan Streptozotocin (STZ) (Akmar & Noor 2020). Pemberian ekstrak akueus *Gynura procumbens* pada dos 150 mg/kg, 300 mg/kg dan 450 mg/kg menurunkan aras glukosa darah semasa berpuasa (FBG) tikus-STZ secara signifikan berbanding tikus kawalan positif dan negatif. Berdasarkan hasil kajian ini, penurunan aras FBG adalah bergantung kepada dos yang diberikan. Ini bermaksud, dos yang lebih tinggi mempunyai kesan pengurangan yang lebih baik menghampiri aras glukosa darah normal. Penemuan ini selari dengan kajian terdahulu oleh Zurina et al. (2010) dan Rosidah et al. (2008) yang menunjukkan kesan anti-hiperglisemia oleh ekstrak *Gynura procumbens* pada subjek diabetes mungkin disebabkan oleh sebatian antioksidan dan polifenol yang tinggi (Hakim et al. 2016).

Sebatian yang diekstrak dari *Gynura procumbens*, Toleaf memberikan kesan antikanser terhadap menghalang pertumbuhan barah barah payudara manakala ekstrak daun etanol *Gynura procumbens* pula menunjukkan kesan anti-proliferatif pada model tikus barah hati aruhan 7,12-dimetilbenz(a)antrasena melalui modulasi sistem imun

(Takanashi et al. 2019). Kesan antikanser rawatan Toleaf pada tiga jenis sel kanser (CT-26, EL-4 dan B16-F10) meningkatkan pengeluaran IFN- $\gamma$  sel splenik dan CD4<sup>+</sup> T limfosit IL-2, IL-4 dan IL-12-mRNA (Protti et al. 2014). Disamping itu, kebolehidupan ketiga-tiga sel kanser menurun setelah limfosit-T dirawat dengan Toleaf. Dapatan kajian ini mencadangkan mekanisme Toleaf mengaktifkan tindak balas imun jenis 1 dan 2T menunjukkan terhadap limfosit CD4<sup>+</sup> T.

Sebatian ekstrak etanolik *Gynura procumbens* iaitu keampferol dilaporkan mempunyai kesan terhadap aktiviti inflamasi. Kajian lepas menunjukkan kesan aktiviti perencatan GSK3 $\beta$  oleh kaempferol keatas sitokin pro-inflamasi iaitu TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  dalam tisu hepar dan serum dalam model tikus yang diinfeksi *B. pseudomallei* (Wong et al. 2015). Kajian ini mendapati pemberian ekstrak *Gynura procumbens* mampu menurunkan aras TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  dan meningkatkan kebolehpaya hidup oleh tikus yang diinfeksi. Dapatan ini jelas menunjukkan keupayaan ekstrak *Gynura procumbens* dalam memodulasi sitokin berkaitan inflamasi.

Tumbuhan *Gynura procumbens* dilaporkan berupaya memperbaiki kecederaan gastrousus aruhan etanol tikus Sprague Dawley (Mahmood et al. 2010). Perlindungan ekstrak *Gynura procumbens* keatas mukosa gastrik dilihat pada pengurangan pembentukan ulser terhadap agen ulserogenik endogenus dan eksogenus melalui kajian histologi. Pengurangan atau ketiadaan edema dan penyusupan leukosit pada lapisan bawah submukosa dilihat pada tikus selepas diberi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg dan 400 mg/kg. Kajian ini mencadangkan pelipatan mukosa yang ditunjukkan mungkin disebabkan oleh penurunan motaliti gastrik yang berperanan dalam mencegah pembentukan ulser gastrik (Devi et al. 2008). Kesan anti-gastrik oleh ekstrak *Gynura procumbens* dikaitkan dengan sebatian aktif seperti flavonoid, saponin, tanin dan terpenoid.

Kesan *Gynura procumbens* ke atas sistem pembiakan menunjukkan peningkatan jumlah dan keupayaan motiliti sperma serta memperbaiki aras hormon testosteron tikus jantan diabetes (Hakim et al. 2016). Kajian toksisiti akut dengan memberikan 2 g/kg dan 5 g/kg ekstrak *Gynura procumbens* secara oral menunjukkan tiada abnormaliti pada perubahan tingkah laku dan perbezaan berat badan yang

direkodkan manakala pemerhatian mikroskopik dan ujian biokimia tidak menunjukkan perbezaan signifikan dengan kumpulan kawalan. Ini menunjukkan bahawa pengambilan ekstrak *Gynura procumbens* secara oral adalah selamat walaupun pada dos yang tinggi (Mahmood et al. 2010).

### **2.6.2 Kesan Kardioprotektif *Gynura Procumbens* Terhadap Penyakit Kardiovaskular**

Beberapa kajian dilakukan untuk mengenal pasti peranan *Gynura procumbens* dalam sistem kardiovaskular. Aktiviti antihipertensi *Gynura procumbens* secara *in-vitro* dan *in-vivo* (Kaur et al. 2013) menunjukkan penurunan tekanan darah dengan mengaruh vasodilasi serta meningkatkan aliran darah (Abrika et al. 2013). Pengaktifan sistem saraf autonomi mengaruh relaksasi pada salur darah melalui tapak jalan kolinergik dengan melepaskan asetilkolin (ACh) dari terminal saraf pada dinding salur darah dan seterusnya merangsang pengeluaran nitrik oksida (NO) yang mengaruh dilatasi pada otot licin vaskular. Dapatan kajian ini mencadangkan kaempferol sebagai calon antihipertensi yang mungkin memberi kesan pada aktiviti vasodilasi (Algariri et al. 2014; Kaewseejan et al. 2015) manakala kaempferol 3-O-rutinoside pula memodulasi tapak jalan kolinergik (Azizi et al. 2019).

Hasil penyelidikan Kim et al. (2006) mendapati, *Gynura procumbens* boleh mengurangkan tekanan darah sistolik pada tikus baka hipertensif spontan dengan suplemen 500 mg/kg *Gynura procumbens*. Ekstrak akueus *Gynura procumbens* menyebabkan pembebasan nitrik oksida ke dalam darah meningkat. Nitrik oksida merupakan pengantara yang dilepaskan oleh endotelium yang berperanan sebagai agen vasodilator (Manicam et al. 2017). Menurut Hoe et al. (2007), *Gynura procumbens* berupaya menentang kesan vasokonstriksi oleh angiotensin II sama ada melalui perencatan aktiviti angiotensin II secara langsung atau secara tidak langsung dengan merencat aktiviti enzim penukar angiotensin. Angiotensin II merupakan vasokonstriksi poten yang terdapat pada kapilari endotelium. Apabila jumlah angiotensin II terhasil dengan banyak, maka tekanan darah arteri akan meningkat. Oleh itu, perencatan aktiviti angiotensin II dan ACE dianggap kaedah yang berkesan untuk merawat hipertensi dan melindungi sistem kardiovaskular.

Sebatian ekstrak akuoues *Gynura procumbens*, FA-1 terbukti menyebabkan vasodilasi, menunjukkan kesan penurunan tekanan darah dan melindungi jantung tikus albino Sprague Dawley melalui penyekatan aktiviti enzim penukaran angiotensin (ACE) (Hoe et al. 2007; Poh et al. 2013). Hasil penyelidikan ini juga membuktikan tindak balas FA-1 terhadap vaskular memberi kesan kepada aktiviti vasokonstriktif Ang II melalui pra-inkubasi FA-1 dalam cincin aorta dengan endotelium-utuh dan endotelium-yang diasingkan. Pemerhatian ini menandakan kesan FA-1 lebih efektif pada cincin aorta dengan endotelium-utuh mungkin disebabkan oleh kehadiran NO (Sandoo et al. 2010) dan prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) (Dalbó et al. 2008). Kesan ini mungkin dimediasi melalui Ang II yang ditukar dari Ang I oleh ACE di cincin aorta (Hayashi & Kimoto 2010). Oleh itu, penghambatan FA-I pada vasokonstriksi vaskular bergantung sepenuhnya pada endotelium. Endotelium memainkan peranan penting dalam pengaturan aktiviti vaskular dengan penghasilan faktor relaksasi dan kontraksi sebagai tindak balas terhadap rangsangan kimia dan fizikal. Kajian ini menunjukkan FA-1 merangsang penghasilan NO oleh eNOS dan menghalang mangkinan penukaran asid arakidonik menjadi prostaglandin (PG) pada tapak jalan COX (Poh et al. 2013). Dapatan ini mencadangkan FA-1 untuk dibangunkan sebagai rawatan alternatif bagi hiopertensi dengan kesan berganda daripada ubatan yang diguankan sekarang.

## **2.7 KAJIAN BERASASKAN METABOLOMIK**

Metabolomik merupakan kajian terhadap profil metabolit global dalam sesebuah sistem biologi yang melibatkan sel, tisu atau organisma. Keseluruhan jumlah sebatian yang terlibat dan dikenalpasti dalam tindak balas biokimia pada tempoh masa tertentu dalam sistem biologi diukur dalam kajian metabolomik (Horgan & Kenny 2011). Hasil kajian berasaskan metabolomik dapat memberikan gambaran menyeluruh terhadap kesan hiliran akibat perubahan pada profil genom, transkriptom dan proteom (Roberts et al. 2012).

Secara umumnya, kaedah metabolomik terbahagi kepada dua pecahan yang berbeza; metabolit yang tidak disasarkan (*untargeted*) iaitu analisis komprehensif yang digunakan untuk mengenal pasti semua identiti metabolit dalam sampel termasuk yang tidak diketahui bahan kimianya dan metabolit yang disasarkan (*targeted*) iaitu

pengukuran identiti metabolit yang diberi ciri biokimianya. Hasil kajian metabolomik yang disasarkan telah menunjukkan kebolehlaksanaan dan keluwesan dalam kajian fisiologi, patologi, intervensi, dan epidemiologi manusia (Du et al. 2013). Sebagai tambahan kepada pengenalpastian metabolit yang terlibat dalam patologi penyakit, kajian metabolomik mempunyai kumpulan pangkalan data berasaskan web yang kukuh dan mapan digunakan sebagai rujukan untuk memahami perubahan mekanisme biokimia metabolit tersebut. Cabaran utama dalam kajian terhadap metabolit tak tersasar (*untargeted*) adalah pengenalpastian metabolit yang memerlukan pangkalan data metabolit yang lebih stabil dan dipercayai untuk mengenal pasti metabolit yang didapati serta pengubahsuaian metabolit biokimia yang mengakibatkan pergeseran spektrum (Mcgarrah et al. 2018). Walaupun begitu, pendekatan kajian terhadap metabolit tidak disasarkan berpotensi untuk mengenal pasti tapak jalan biokimia baru, penanda biologi penyakit dan metabolit yang berpotensi dalam perubatan (Watrous et al. 2017).

Profil metabolit yang diperoleh boleh dipengaruhi oleh penyakit, gaya hidup dan tabiat pemakanan (Clark-Matott et al. 2015; Huang et al. 2014; Viana et al. 2016). Selain itu, faktor persekitaran seperti pendedahan kepada bahan pencemaran dan pengambilan ubat-ubatan juga berupaya mengubah profil metabolik (Riera-Borrull et al. 2017; Vlaanderen et al. 2017). Oleh itu, kajian yang menggunakan teknik berasaskan metabolomik ini dapat memberikan penerangan lebih terperinci pada skala global berkenaan mekanisme pembentukan penyakit serta bagaimana agen terapeutik berfungsi dalam mengawal penyakit tersebut.

### **2.7.1 Modulasi Profil Metabolit Penyakit Kardiovaskular**

Perubahan profil metabolik terhadap penyakit kardiovaskular dalam sampel biologi seperti serum, plasma, dan homogenat tisu jantung telah dilaporkan oleh beberapa kajian sebelum ini (Barderas et al. 2011; Moghadasian et al. 2019; Zhu et al. 2018). Kajian oleh Barderas et al. (2011) melaporkan profil metabolit darah periferel pesakit infarksi miokardium (MI) dirancang telah ditentukan menggunakan 36 sampel darah pesakit pra- dan pasca-PMI menggunakan spektrometri jisim. Dapatan kajian ini mendapati perencatan pada profil metabolik melibatkan beberapa tapak jalan biokimia

antaranya, kitaran asid trikarboksilat, metabolisme purina dan pirimida serta tapak jalan pentosa fosfat. Terdapat tujuh metabolit yang terjejas secara signifikan pada pesakit pasca-MI iaitu alanin, asid aminoisobratik, hipoxantina, isoleusina / leusina, asid malonik, treonina dan trimetilamina N-oksida (TMNO). Perubahan yang berlaku pada metabolit-metabolit dibandingkan dengan peningkatan yang signifikan pada penanda biologi yang didapati secara klinikal melibatkan kreatina kinase jakur miokardium (CKMB) dan troponin T. Dalam eksperimen yang sama, enam metabolit baru juga berubah dengan ketara ( $p < 0.05$ ) iaitu 1-metilhistamin, kolin, inosin, serin, prolin dan xantina yang dilihat mempunyai potensi sebagai calon penanda pembentukan plak pada model tikus aterosklerosis (Leo & Darrow 2009).

Satu lagi kajian lepas menunjukkan perubahan pada profil metabolit plasma pada pesakit MI (Zhu et al. 2018). Dalam kajian ini, sampel plasma pesakit MI dan orang yang sihat dianalisa menggunakan kromatografi cecair ultra-prestasi / spektrometri jisim untuk mengenal pasti penanda biologi penyakit MI. Hasil kajian ini menunjukkan perencatan berlaku pada tapak jalan biokimia akibat MI yang melibatkan beberapa metabolit penting seperti fosfatidilserina, kolina linoleamidogliserofosfat, lyso-PC (C18:2), lyso-PC (C16:0), lyso-PC (C18:1), arakidonik amida, N-metil arakidonik amida, C16-sfingosina, asid arakidonik dan asid linoleik. Perubahan pada metabolit-metabolit ini menunjukkan gangguan pada metabolisme tenaga, fosfolipid dan metabolisme asid lemak pada pesakit MI. Dapatan ini berpotensi untuk dimajukan sebagai rawatan alternatif untuk diagnosis dan pencegahan penyakit MI.

Kajian mekanisme penyakit hipertensi arteri pulmonari ditunjukkan melalui pengenalanpastian penanda biologi menggunakan pendekatan metabolomik (Chen et al. 2020a). Dalam kajian ini, lipatan perubahan bagi metabolit l-karnitin, asetil-l-karnitin dan beberapa asilkarnitin rantai panjang termasuk pal-mitoilkarnitin, oleoilkarnitin, desenoilkarnitin, linoilaidil karnitin, cis-5-tetradesenoilkarnitin dan trans-2 dodesenoilkarnitin dalam darah periferel pesakit PAH meningkat berbanding pesakit kawalan yang sihat. Penyekatan metabolisme asid lemak  $\beta$ -pengoksidaan menyebabkan pengumpulan asil-CoA berlaku. Asil-CoA yang bergabung dengan karnitin dan kemudian dieksport dari sel ke cecair ekstrasel lalu menyebabkan peningkatan aras asilkarnitine dalam periferel. Peningkatan aras karnitin dan asilkarnitin mencadangkan

perencatan ketara pada metabolisme asid mitokondria pengoksidan- $\beta$  semasa perkembangan PAH.



## **BAB III**

### **BAHAN DAN KAEDAH**

#### **3.1 BAHAN**

##### **3.1.1 Tumbuhan Kajian**

Kajian ini menggunakan pokok sambung nyawa atau nama saintifiknya *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. yang diperoleh dari Semenyih, Selangor pada 20 Februari 2016. Tumbuhan ini dikenal pasti dan disimpan di herbarium Universiti Kebangsaan Malaysia (Bangi) dengan nombor baucar UKMB40411.

##### **3.1.2 Haiwan Kajian**

Tikus betina dewasa Sprague Dawley diperoleh dari Unit Sumber Haiwan Makmal, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia. Kaedah pengendalian haiwan diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC) dengan nombor kelulusan BIOD/PP/2016/ZAKIAH/28-SEPT./779-SEPT.-2016-JAN.-2019 (LAMPIRAN A).

##### **3.1.3 Bahan Kimia dan Alat Radas**

Bahan kimia dan alat radas yang digunakan dalam kajian ini disenaraikan seperti berikut:

**a. Persampelan Darah dan Tisu**

**i. Darah**

Bahan kimia yang digunakan ialah larutan anestetik dietil eter (R&M Chemicals, United Kingdom), larutan formaldehid 37% (Merck KGaA, Jerman), natrium fosfat dwihidrat (Riedel-de-Haen, Jerman) dan natrium dwihidrogen fosfat (Riedel-de-Haen, Jerman).

Alat radas yang digunakan ialah tiub kapilari tidak bersalut (Hirschman, Jerman), picagari 1 mL (Terumo), tiub darah falcon 15 mL (BD Biosciences, USA), tiub heparin (BD Vacutainer®), tiub biasa, mesin pengempar model 5810R (Eppendorf, Jerman), tiub eppendorf 2 mL (Eppendorf, Jerman), tiub emparan mikro 1 mL (Sorenson™ BioScience Inc., Amerika Syarikat) dan peti penyimpanan bersuhu -80 °C model MDF-U53V (Sanyo, Jepun).

**ii. Tisu**

Bahan kimia yang digunakan ialah formalin (HmbG Chemicals, Jerman) dan larutan salina penimbal fosfat (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat).

Alat radas yang digunakan untuk penyediaan tisu ialah botol spesimen 60 mL (Globe Scientific).

**b. Berat Badan Tikus**

Alat radas yang digunakan ialah penimbang digital model 1144 (Tanita, Jepun).

**c. Tekanan Darah Tikus**

Alat radas yang digunakan ialah Powerlab (ADInstruments, Australia) dan bekas penahan.

**d. Diet Haiwan**

Bahan yang digunakan ialah palet komersial (Gold Coin, Malaysia), minyak masak kelapa sawit jenama Buruh (Lam Soon, Malaysia), palet 2% kolesterol (MP Biomedicals, Amerika Syarikat) dan ubi keledak. Palet komersial diperolehi dari Unit Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia manakala palet 2% kolesterol dibeli daripada pembekal dari Singapura.

Alat radas yang digunakan adalah alat pengisar, kualiti keluli, ketuhar dan termometer pengukur suhu minyak panas (Allianze Electric, China).

**e. Pembedahan Haiwan**

Bahan kimia yang digunakan ialah alkohol berkepekatan 70% dan agen anestetik iaitu campuran ketamin dan xylazil dengan kepekatan masing-masing adalah 80 mg/mL dan 10 mg/mL (Ilium®).

Alat radas yang digunakan untuk pembedahan ialah gunting besi keluli, pisau bedah nombor 11, forsep dan pengapit.

**f. Pewarnaan Verhoef van Gieson**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Sigma-Aldrich (Amerika Syarikat) iaitu ferik klorida, larutan hematoksin, alkohol dan iodine Weigert's.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pemprosesan tisu automatik (Thermo Scientific, Amerika Syarikat), mesin pembenam tisu model EG1160 (Leica Biosystem, Jerman), mikrotom (Leica Biosystem, Jerman), bikar 500 mL, silinder penyukat dan tiub falcon 15 mL (BD Biosciences, Amerika Syarikat), *cassette* jaringan, staining jar, kertas penapis, slaid kaca 76 x 25.4 x 1.02 mm (HmBG, China) penutup slaid kaca (Matsunami Glass, Jepun), balang *coplin* dan mikroskop beza jelas fasa (BX50, Olympus).

**g. Pewarnaan Minyak Merah O**

Bahan kimia yang digunakan ialah larutan 2-propanol 60% (Sigma, Amerika Syarikat), larutan minyak merah O (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat), larutan salina penimbal fosfat (Sigma-Aldrich, USA), komponen pemotong suhu optimum (Agar Scientific, United Kingdom).

Alat radas yang digunakan ialah mikrotom kriostat (Sigma, Amerika Syarikat), kertas penapis, slaid kaca 76 x 25.4 x 1.02 mm (HmBG, China), penutup slaid kaca (Matsunami Glass, Jepun) dan mikroskop beza jelas fasa (BX50, Olympus).

**h. Ujian Fungsi Hepar dan Ginjal**

Ujian fungsi hepar dan ginjal diukur menggunakan khidmat makmal UNILAB Diagnostics Sdn. Bhd.

**i. Penentuan Profil Lipid Serum**

**i. Triasilgliserol jumlah**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama EnzyChrome™ (BioAssay Systems) iaitu penimbal asai, salina penimbal fosfat, trifosfat adenosina (ATP), lipase, reagen pewarna, campuran enzim dan piawai trigliserida.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunisorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

**ii. Kolesterol jumlah**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama EnzyChrome™ (BioAssay Systems) iaitu penimbal asai, reagen pewarna, campuran enzim dan piawai kolesterol.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunosorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

### **iii. Lipoprotein berketumpatan rendah**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama EnzyChrome™ (BioAssay Systems) iaitu penimbal asai, salina penimbal fosfat, reagen pewarna, reagen pemendakan, campuran enzim dan piawai kolesterol.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunosorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vorteks model Fine Vorteks (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

### **iv. Lipoprotein berketumpatan tinggi**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama EnzyChrome™ (BioAssay Systems) iaitu penimbal asai, salina penimbal fosfat, reagen pewarna, reagen pemendakan, campuran enzim dan piawai kolesterol.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunosorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

### **j. Penentuan Aras Malondialdehid Plasma**

Bahan kimia yang digunakan ialah natrium hidroksida (NaOH) (Merck, Jerman), asid hidroklorik (HCl) (Merck, Jerman), asid sulfurik pekat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Merck, Jerman),

asetonitril gred HPLC (Merck, Jerman), asid asetik glasial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Merck, Jerman), asid perklorik ( $\text{HClO}_4$ ) (Ajax Chemicals, Australia), 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP) (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat) dan air bergred HPLC Milli-Q<sup>®</sup>.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin HPLC dengan pengesanan PDA (Shimadzu, Jepun), kolum C-18 150 mm x 3.9  $\mu\text{m}$  (Waters, Amerika Syarikat), kukusan air, pam vakum (Corning, England), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), penuras membran 0.45  $\mu\text{m}$  (Sartorius AG, Jerman), penggetar ultrasonik (Sonicor, USA), penuras picagari 0.45  $\mu\text{m}$  (Sartorius AG, Jerman), picagari 1 mL (Terumo), vial ambar (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat), kelalang kon Duran (Schott, Amerika Syarikat), penuras model *Ultra-ware Kontes* (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat), pemegang penuras model Pyrex (Millipore, Amerika Syarikat), plat mikrotiter 96 telaga (Thermo Scientific, Amerika Syarikat) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning, Amerika Syarikat).

#### **k. Penentuan Aktiviti Enzim Antioksidan Eritrosit**

##### **i. Katalase**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Cayman Chemical (Amerika Syarikat) iaitu penimbal asai katalase (10X), penimbal sampel katalase (10X), piawai katalase formaldehid, katalase, kalium hidroksida katalase, hydrogen peroksida katalase, purpald katalase dan kalium periodat katalase.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunosorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat), vortek (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

## ii. Glutation peroksidase

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Cayman Chemical (Amerika Syarikat) iaitu penimbal asai glutation peroksidase (10X), penimbal sampel glutation peroksidase (10X), piawai glutation peroksidase, campuran ko-substrat glutation peroksidase, kumene hidroperoksida dan NADPH.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunosorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat), vortek (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

## iii. Superoksida dismutase

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Cayman Chemical Amerika Syarikat) iaitu penimbal asai (10X), penimbal sampel (10X), pengesan radikal, piawai superoksida dismutase dan xantin oksida.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunosorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat), vortek (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

## I. Pengukuran Kereaktifan Aorta

Bahan kimia yang digunakan ialah larutan natrium klorida (NaCl) (BDH Limited dan BDH Laboratory Supplies, Poole, England), kalium klorida (KCl) (BDH Limited dan BDH Laboratory Supplies, Poole, England), kalium klorida dwihidrat ( $\text{Ca.Cl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ ) (BDH Limited dan BDH Laboratory Supplies, Poole, England), kalium dwihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (BDH Limited dan BDH Laboratory Supplies, Poole, England),

magnesium sulfat ( $\text{MgSO}_4$ ) (BDH Limited dan BDH Laboratory Supplies, Poole, England), glukosa (BDH Limited dan BDH Laboratory Supplies, Poole, England), natrium karbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) (BDH Limited dan BDH Laboratory Supplies, Poole, England), asetil klorida (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), fenilferin hidroklorida (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, Amerika Syarikat), natrium nitroprusida (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, Amerika Syarikat), gas campuran 95% oksigen dan 5% karbon dioksida (MOX, Malaysia).

Alat radas yang digunakan ialah penimbang elektronik model FX3200 (AND, Jepun), pengacau magnetik, daya anjakan transduser (FT03E, Grass Instruments, west Warwick, RI, Amerika Syarikat), sistem rakaman (MacLab model 8 S, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia), mesin vortek SA Sturat (Bobby Scientific Ktd., United Kingdom), piring petri, silinder penyukat 100 mL, tiub mikroempar 1.5 mL (Eppendorf, Jerman), tiub falcon 15 mL (BD Biosciences, Amerika Syarikat) dan bikar 1000 mL.

**m. Penentuan Aras Nitrik Oksida Plasma**

Bahan kimia yang digunakan ialah natrium nitrit (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat) dan reagen griess terubahusai (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat).

Alat radas yang digunakan ialah plat mikrotiter 96 telaga (Thermo Scientific, Amerika Syarikat) dan mesin ELISA model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat).

**n. Penentuan Aktiviti Nitrik Oksida Jenis Endotelium Plasma**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Elabscience Biotechnology (Amerika Syarikat) iaitu piawai rujukan, antibodi pengesan biotinil pekat (100X), konjugat peroksidase lobak kuda pekat, pencair sampel dan piawai, pencair antibodi pengesan biotinil, pencair konjugat peroksidase lobak kuda, pencuci penimbal pekat (25X), reagen substrat dan larutan berhenti.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunisorben (ELISA)

model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Elabscience Biotechnology, Amerika Syarikat), vortek (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

**o. Penentuan Aktiviti Nitrik Oksida Sintase Jenis Induksi Plasma**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Elabscience Biotechnology (Amerika Syarikat) iaitu piawai rujukan, antibodi pengesan biotinil pekat (100X), konjugat peroksidase lobak kuda pekat, pencair sampel dan piawai, pencair antibodi pengesan biotinil, pencair konjugat peroksidase lobak kuda, pencuci penimbal pekat (25X), reagen substrat dan larutan berhenti.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunosorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat), vorteks (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

**p. Penentuan Aras Penanda Inflamasi Plasma**

**i. Interlukin-6**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Elabscience Biotechnology (Amerika Syarikat) iaitu piawai rujukan, antibodi pengesan biotinil pekat (100X), peroksidase lobak kuda konjugat pekat (100X), pencair sampel dan piawai, pencair antibodi pengesan biotinil, pencair peroksidase lobak kuda konjugat, pencuci penimbal pekat (25X), reagen substrat dan larutan berhenti.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunosorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika

Syarikat), vortek (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

**ii. Faktor nekrosis tumor-alfa**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Elabscience Biotechnology (Amerika Syarikat) iaitu piawai rujukan, antibodi pengesan biotinil pekat (100X), peroksidase lobak kuda konjugat pekat (100X), pencair sampel dan piawai, pencair antibodi pengesan biotinil, pencair peroksidase lobak kuda konjugat, pencuci penimbal pekat (25X), reagen substrat dan larutan berhenti.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunisorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vorteks model Fine Vorteks (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat), vorteks (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

**iii. Protein reaktif C**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Elabscience Biotechnology (Amerika Syarikat) iaitu piawai rujukan, antibodi pengesan biotinil pekat (100X), peroksidase lobak kuda konjugat pekat (100X), pencair sampel dan piawai, pencair antibodi pengesan biotinil, pencair peroksidase lobak kuda konjugat, pencuci penimbal pekat (25X), reagen substrat dan larutan berhenti.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim imunisorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Cayman Chemical, Amerika Syarikat), vortek (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

**q. Penentuan Aras Isyarat Vaskular Endotelium Aorta**

**i. Molekul lekatan vaskular terlarut-1**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Elabscience Biotechnology (Amerika Syarikat) iaitu piawai rujukan, antibodi pengesan biotinil pekat (100X), peroksidase lobak kuda konjugat pekat (100X), pencair sampel dan piawai, pencair antibodi pengesan biotinil, pencair peroksidase lobak kuda konjugat, pencuci penimbal pekat (25X), reagen substrat dan larutan berhenti.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim immunosorben (ELISA) model VersaMax (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Elabscience Biotechnology, Amerika Syarikat), vortek (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

**ii. Molekul lekatan intersel terlarut-1**

Bahan kimia yang dibekalkan oleh pengilang kit jenama Elabscience Biotechnology (Amerika, Syarikat) iaitu piawai rujukan, antibodi pengesan biotinil pekat (100X), HRP konjugat pekat (100X), pencair sampel dan piawai, pencair antibodi pengesan biotinil, pencair HRP konjugat, pencuci penimbal pekat (25X), reagen substrat dan larutan berhenti.

Alat radas yang digunakan ialah mesin pengempar mikro bersuhu 5415R (Eppendorf, Jerman), plat mikrotiter 96 telaga (Elabscience), mesin bacaan plat asai rangkaian enzim immunosorben (ELISA) model *versamax* (Molecular Devices, Amerika Syarikat), mesin vortek model Fine Vortek (FinePCR, Korea), plat mikrotiter 96 telaga (Elabscience Biotechnology, Amerika Syarikat), vortek (VELP Scientifica, Itali) dan tiub mikroempar 1.5 ml (Corning Scientific, Amerika Syarikat).

**r. Analisis Profil Metabolomik**

**i. Penghomogenan Aorta**

Bahan kimia yang digunakan ialah salina penimbang fosfat (PBS) (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat), cecair nitrogen, larutan metanol tulen (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat) dan cecair kloroform (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat).

Alat radas yang digunakan ialah penggetar ultrasonik model Q55 (QSonica, Amerika Syarikat), penggetar model MSV-3500 Multi Speed Vorteks (Biosan, Latvia), penggetar dengan kawalan suhu Thermo-Shaker model TS-100 (Biosan, Latvia), pengempar mikrocentrifuge model 5415R (Eppendorf, Jerman), tiub emparan 2 mL (Tarsons, India) dan peti penyimpanan bersuhu -80 °C model MDF-U53V (Sanyo, Jepun).

**ii. Penyediaan Fasa Gerak**

Bahan kimia yang digunakan ialah air ultra-tulen Optima<sup>®</sup> bergred MS (Fischer Scientific, Amerika Syarikat), asetonitril 100% bergred MS (Fischer Scientific, Amerika Syarikat) dan asid formik 100% (Thermo Fischer Scientific, Amerika Syarikat).

Alat radas yang digunakan ialah botol Schott berkapasiti 1 L model Duran<sup>®</sup> (Schott AG, Germany) dan sonikator Texsonic model TUC-P40H (Sonicron Sdn. Bhd., Malaysia).

**iii. Bancuhan Semula**

Bahan kimia yang digunakan ialah metanol tulen bergred MS (Fischer Scientific, Amerika Syarikat) dan air ultra-tulen Optima<sup>®</sup> bergred MS (Fischer Scientific, Amerika Syarikat).

Alat radas yang digunakan ialah picagari 1 mL (Terumo), penapis picagari jenis selulosa terjana semula bersaiz 0.2 µm model Minisart RC4 (Sartorius Stedim Biotech,

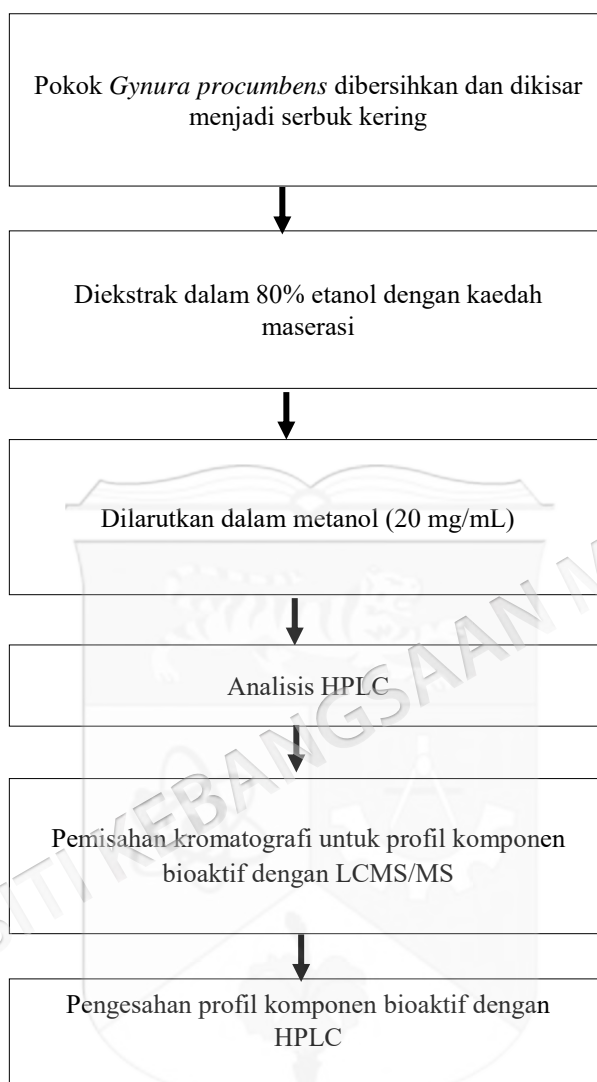
Germany), tiub sisip gelas berspring ganda (Thermo Fischer Scientific, Amerika Syarikat) dan vial berserta penutup (Thermo Fischer Scientific, Amerika Syarikat).

**iv. Kromatografi Cecair Spektrometri Jisim**

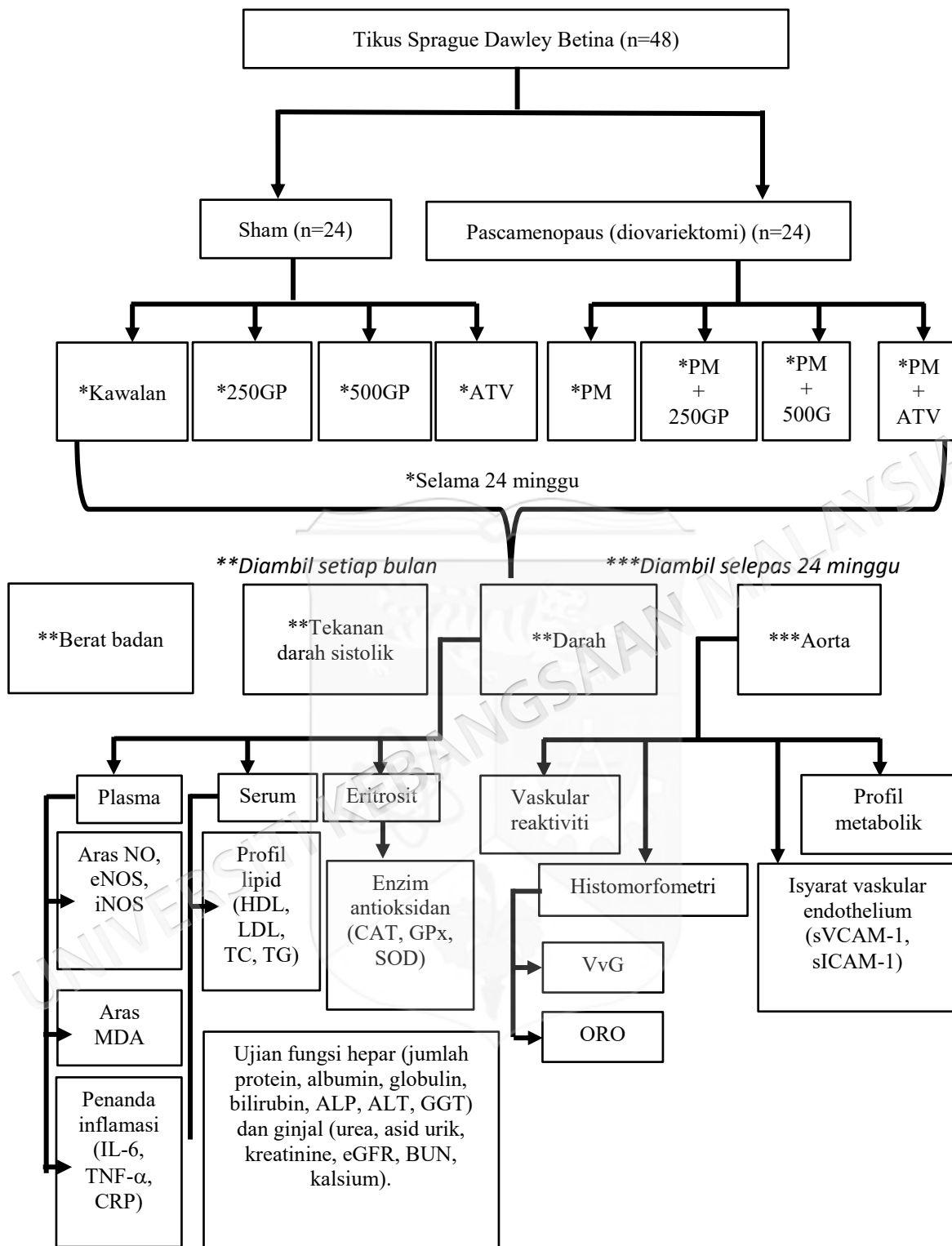
Peralatan yang digunakan ialah mesin kromatografi cecair berprestasi ultra-tinggi (UHPLC) model Dionex UltiMate™ 3000 Rapid Separation digandingkan dengan mesin spektrometri jisim model Q Exactive™ HF hibrid kuadropol-Orbitrap spektrometri jisim (Thermo Fischer Scientific, Amerika Syarikat).



### 3.2 REKA BENTUK KAJIAN



Rajah 3.1 Reka Bentuk Kajian 1



Rajah 3.2 Reka Bentuk Kajian 2

### 3.3 KAEDAH

#### 3.3.1 Pengekstrakan *Gynura Procumbens*

Keseluruhan bahagian pokok *Gynura procumbens* sebanyak 50 kg dikumpulkan, dibersihkan dan ditimbang serta dikeringkan pada suhu bilik selama 3 hari. Pokok *Gynura procumbens* yang telah kering dihantar ke makmal Ethnoherbs Sdn. Bhd untuk diproses dan dikisar dan serbuk kering sebanyak 1900 g telah dihasilkan. Seterusnya, serbuk kering *Gynura procumbens* diekstrak dengan 80% etanol pada nisbah 1: 20 (b/i) selama 24 jam menggunakan kaedah maserat. Proses pemaseratan diulang sebanyak tiga kali secara berterusan. Ekstrak *Gynura procumbens* dituras menggunakan kertas turas Whatman No. 1. Hasil turasan dikumpulkan dan pelarut berlebihan disejat menggunakan penyejat berputar pada 55 °C. Langkah ini menghasilkan ekstrak hijau gelap seberat 92 g. Ekstrak etanol *Gynura procumbens* disimpan dalam botol kaca pada -4 °C untuk kegunaan selanjutnya.

Seterusnya, stok ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* disediakan dalam larutan metanol pada kepekatan 20 mg/mL. Manakala stok piawai rujukan iaitu asid klorogenik disediakan pada kepekatan 1 mg/mL. Kedua-dua larutan stok kemudian dicairkan (pencairan dua kali ganda) kepada beberapa kepekatan. Larutan ekstrak dan piawai rujukan kemudian dianalisis secara berasingan menggunakan HPLC dengan penetapan keadaan berikut; turas analitikal XBridge™ C18 (4.6 × 250 mm, 5 mm) digunakan pada Waters 2535 Modul Gradien Quaternary dengan tatasusunan pengesan foto-diod (Waters 2998) yang dibaca pada panjang gelombang antara 210 hingga 350 nm menggunakan Waters Prep Degasser.

Fasa gerak mengandungi asetonitril (A) dan 0.1% asid ortofosforik (B) dengan sistem kecerunan berperingkat (10% A-90%, B pada 0 min, 30% A-70% B pada 30 min, 100 %, dan 100 % A pada 70 min) dengan kadar aliran 1 ml per minit pada setiap 10 µL suntikan sampel ekstrak *Gynura procumbens*. Pengenalpastian dan pengukuran asid klorogenik dalam ekstrak *Gynura procumbens* juga dilakukan dengan membandingkan masa retensi dan puncak spektrum UV-V sampel dengan 3 puncak piawai (asid klorogenik) melalui lengkung penentuan asid klorogenik yang diplotkan. Tiada penilaian terhadap logam berat, racun perosak, dan bahan toksik

dilakukan. Pengekstrakan *Gynura procumbens* dijalankan oleh kumpulan penyelidik dari Pusat Penyelidikan Ubatan dan Herbal (DHRC) Fakulti Farmasi, Universiti Kebangsaan Malaysia (Rajah 3.1).

Analisis kromatografi cecair spektrum cecair (LC-MS/MS) dijalankan untuk menentukan komponen bioaktif yang terkandung dalam ekstrak *Gynura procumbens*. Pemisahan kromatografi dilakukan untuk memaparkan profil komponen bioaktif menggunakan sistem UHPLC Perkin Elmer Flexar FX15 UHPLC yang digabungkan dengan perangkap *hibrid triple quad tandem* spektrometer jisim Sciex 3200 (UHPLC-MSMS) serta dilengkapi dengan *autosampler* dan tiang Phenomenex Synergy RP C18 (100 Å, 100 × 2.0 mm, 3 µM). Fasa mobil yang digunakan terdiri daripada; air dan 0.1% asid formik (A) serta asetonitril yang ditambah dengan 0.1% asid formik (B). Mod pengesanan yang digunakan adalah tindak balas sasaran pelbagai pemantauan (MRM) untuk ionisasi elektrospray negatif. Puncak komponen bioaktif yang dikesan dibandingkan dengan perpustakaan spektral jisim.

Kaedah HPLC disahkan menggunakan asid klorogenik sebagai rujukan piawai. Pengesanan analisis HPLC telah dijalankan mengikut garis panduan ICH. Kajian pengesanan melibatkan kepersisan, kelinearan, had pengesanan (LOD) dan had kuantitasi (LOQ). Kepersisan telah ditentukan berdasarkan dua peringkat iaitu kebolehlulangan (ketepatan di bawah kaedah yang sama dalam tempoh masa yang singkat atau ketepatan intra-assay) dan ketepatan perantaraan (penilaian prestasi kaedah pada hari yang berbeza atau ketepatan antara hari).

Tiga kepekatan piawai rujukan asid klorogenik iaitu 3.91, 31.25, dan 250 µg per mL, telah disuntik sebanyak tiga kali untuk setiap kepekatan dalam satu hari (*intraday*) dan pada tiga hari yang berbeza (*interday*). Lengkung penentukuran piawai rujukan ditubuhkan dengan siri kepekatan iaitu 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, dan 3.90625 µg per mL dalam tripliket. Lengkung penentukuran telah dibina dengan mengambil kira kawasan puncak yang sepadan (*response*) terhadap kepekatan piawai rujukan yang disuntik. Kelinearan telah dinilai dengan menggunakan parameter regresi dari lengkung penentukuran dan pekali korelasi ( $R^2$ ), yang dikira menggunakan

lengkung pembolehubah. LOD dan LOQ dikira dari RSD (baki sisihan piawai) dan cerun (S) lengkung penentukuran menggunakan persamaan (1) dan (2):

$$LOD = 3.3 \times \left( \frac{RSD}{S} \right) \quad \dots(3.1)$$

$$LOQ = 10 \times \left( \frac{RSD}{S} \right) \quad \dots(3.2)$$

### 3.3.2 Eksperimen

Sebanyak 48 ekor tikus betina dewasa baka Sprague Dawley yang mempunyai berat di antara 250 hingga 300 g telah digunakan. Haiwan ini ditempatkan di dalam sangkar besi yang beralaskan habuk kayu, diberi makanan dan sumber air secara *ad libitum*. Dua ekor tikus ditempatkan di dalam setiap sangkar berlabel. Semua sangkar diletakkan di dalam sebuah bilik yang dikhaskan pada suhu  $22 \pm 2$  °C dengan sumber cahaya yang dikawal secara automatik untuk kitaran 12 jam siang dan 12 jam gelap. Haiwan-haiwan dibiarkan menyesuaikan diri selama dua minggu untuk mengelakkan tekanan sebelum kajian dilakukan. Kajian ini dijalankan di makmal Jabatan Biokimia dan Jabatan Farmakologi, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia.

Selepas tamat tempoh penyesuaian diri, sebanyak 24 ekor tikus dipilih secara rawak untuk diovariectomi iaitu membuang kedua-dua ovari untuk menghasilkan keadaan kekurangan estrogen pasca menopause dan tikus selebihnya menjalani pembedahan yang serupa untuk mensimulasikan tekanan pembedahan tanpa membuang ovari. Prosedur pembedahan dilakukan dibawah pengaruh anastesia. Seterusnya, tikus dibahagikan secara rawak kepada lapan kumpulan iaitu sham; kawalan, 250GP, 500GP, ATV dan pascamenopause; PM, PM+250GP, PM+500GP dan PM+ATV. Tikus kumpulan sham diberi diet komersial diikuti dengan suplementasi ekstrak GP pada dos 250 mg/kg (250GP), 500 mg/kg (500GP) atau atovarstatin (ATV) pada dos 10 mg/kg. Manakala tikus kumpulan pascamenopause diberi diet 2 % kolesterol diperkaya minyak masak lima kali pemanasan (PM) serta suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* (250 mg/kg; PM+250GP atau 500 mg/kg; PM+500GP) atau ATV (dos 10 mg/kg; PM+ATV). GP dan ATV diberi secara oral sekali setiap hari selama 24 minggu. ATV

diberi sebagai kawalan positif dalam kajian ini. Sepanjang kajian dijalankan, berat badan dan tekanan darah sistolik diukur serta darah diambil pada setiap bulan.

Selepas 24 minggu, tikus dibunuh dengan mendedahkan tikus kepada dietil eter pada dos berlebihan dan organ seperti aorta, hepar dan renal diambil. Reaktiviti vaskular aorta diukur menggunakan mesin mandian organ untuk menguji keutuhan cecincin aorta yang dikontraksikan dan direlaksasikan. Aorta juga diguna dalam kajian histomorfometri melalui pewarnaan Verhoeff van Gieson (VvG) untuk mengukur ketebalan tunika media, intima serta lumen dan Minyak Merah O (ORO) untuk mengukur pengumpulan titik lemak pada tisu aorta. Ujian serum fungsi hepar dan ginjal dilakukan di makmal UNILAB Diagnostics Sdn. Bhd. Ketebalan media, tunika, adventisia tunika dan diameter lumen aorta juga dihitung. Profil lipid; HDL, LDL, TC dan TG ditentukan dengan ELISA dan produk peroksidasi lipid iaitu MDA dalam plasma diukur menggunakan HPLC. Aktiviti enzim antioksidan dalam eritrosit seperti CAT, GPx dan SOD, aras penanda inflamasi (IL-6, TNF- $\alpha$  dan CRP) dalam plasma serta aras isyarat vaskular endothelium pada aorta diukur menggunakan kit ELISA. Kajian ini diakhiri dengan mengkaji keseluruhan perubahan yang berlaku pada pengekspresan profil metabolit aorta yang ditentukan melalui kaedah LC-MS/MS. Reka bentuk kajian ditunjukkan dalam Rajah 3.2.

### **3.3.3 Prosedur Pembedahan Haiwan**

Sebelum prosedur pembedahan dijalankan, haiwan dibiarkan berpuasa selama 2 hingga 3 jam tanpa menyekat sumber minuman. Setelah itu, tikus dibius secara intraperitoneal (IP) dengan suntikan campuran ketamin (80 mg/kg) dan xylazine (10 mg/kg) dengan nisbah 1:1 berdasarkan 0.1 mL setiap 100 g berat badan tikus. Pada pasca-anestesia, keadaan tikus dipantau untuk menghindari kegagalan fungsi jantung dan pernafasan. Suhu badan tikus juga diukur dengan menggunakan termometer rektum untuk mengesan jika berlakunya hipotermia akibat tekanan fisiologi. Jika ia berlaku, proses pemulihan pasca pembedahan akan mengambil masa yang lama dan sekiranya berpanjangan akan menyebabkan kematian.

Sebelum pembedahan ovariektomi dimulakan, bahagian tengah kawasan perut dicukur dan dibersihkan dengan alkohol 70 %. Satu insisi peritoneal secara melintang

berukuran 1 cm dilakukan pada kawasan tengah abdomen berhampiran dengan puting sebelah kanan menggunakan pisau bedah nombor 11. Setelah rongga peritoneal dibuka, tisu adiposa ditarik keluar sehingga tiub rahim kanan dan ovari yang dikelilingi oleh lemak dikenal pasti. Ovari ditarik keluar dari rongga peritoneal dengan berhati-hati untuk mengelakkan daripada pemotongan cebisan kecil ovari, yang mungkin jatuh ke perut di mana ia boleh diimplan secara semulajadi dan menjalankan fungsi normalnya. Prosedur sama diulang untuk ovari kiri melalui rongga peritoneal yang sama. Rongga peritoneal ditutup dalam dua lapisan (otot dan kulit) dengan jahitan steril. Lapisan peritoneum dan otot dijahit dengan satu jahitan yang dapat diserap (Ethicon chromic sutures-3/0, Johnson & Johnson Ltd., India) dan kulit dijahit dengan satu jahitan yang tidak dapat diserap (Ethicon mersilk sutures-3/0, Johnson & Johnson Ltd., India). Setelah selesai, iodin disembur pada luka dan sebanyak 0.1 mL antibiotik (Baytril® 5%) disuntik secara intra otot (IM) sebagai profilaksis jangkitan kuman pada luka selama lima hari. Selepas pembedahan, tikus ditempatkan secara berasingan dalam kotak poliuretana dengan beralaskan kertas turas Whatman No. 42 yang diganti setiap hari selama satu minggu untuk proses pemulihan serta mengelakkan jangkitan pada kawasan luka selepas pembedahan. Jahitan diperiksa setiap hari bagi memastikan luka sembuh sepenuhnya. Prosedur pembedahan dilakukan dengan teknik aseptik (Khajuria et al. 2012).

Pembedahan yang serupa di lakukan pada tikus kumpulan sham tanpa mengeluarkan ovari tikus. Kedua-dua ovari hanya diperiksa untuk memastikan tiada sebarang masalah pada struktur ovari. Setelah diteliti, ovari dimasukkan semula ke dalam rongga peritoneal sebelum otot dan kulit dijahit semula. Tikus kumpulan sham yang melalui pembedahan menerima penjagaan dan rawatan yang sama seperti kumpulan tikus pascamenopaus selepas pembedahan.

### **3.3.4 Penyediaan Diet Haiwan**

#### **a. Minyak masak lima kali pemanasan**

Sebanyak 2500 mL minyak sawit segar digunakan untuk menggoreng 1 kg ubi keledak yang dibuang kulit dan dihiris. Ubi keledak digoreng menggunakan kualiti keluli. Minyak sawit segar dipanaskan sehingga mencapai suhu 180 °C yang diukur

menggunakan termometer pengukur suhu minyak panas. Proses penggorengan ubi keledak secara rendaman minyak penuh (*deep fried*) mengambil masa selama 10 minit sehingga ubi keledak bertukar warna kuning keemasan. Kemudian, minyak yang digunakan untuk menggoreng dibiarkan sejuk pada suhu bilik selama 5 jam sebelum digunakan semula untuk penggorengan yang seterusnya. Proses pemanasan dan penyejukan diulang sebanyak empat kali tanpa menambah minyak yang berkurangan bagi mendapatkan minyak sawit dipanaskan lima kali (5HPO). Proses pemanasan minyak adalah seperti yang diterangkan oleh Owu et al (1998).

#### **b. Diet Kolesterol**

Dalam kajian ini, diet yang diberi kepada tikus pascamenopaus diformulasikan dengan campuran pelet 2% kolesterol dan 5HPO. Sebanyak 850 g pelet 2% kolesterol dikisar dan dicampur dengan 150 g minyak sawit dipanaskan lima kali. Ini menjadikan diet mengandungi 15% (b/b) 5HPO. Kemudian, diet dibentuk semula menjadi seperti bebola dan dibiarkan kering pada suhu 70 °C menggunakan ketuhar. Diet yang telah kering disimpan di dalam beg plastik bersih dan kedap udara untuk mengelakkan pertumbuhan kulat disebabkan kelembapan dan pengoksidaan di dalam udara.

#### **3.3.5 Penyediaan *Gynura Procumbens* dan Atorvastatin**

Kajian ini menetapkan dos ekstrak *Gynura procumbens* digunakan adalah 250 mg/kg dan 500 mg/kg berdasarkan kajian lepas (Kim et al. 2006). Ekstrak *Gynura procumbens* diterima dari Pusat Penyelidikan Ubatan dan Herba, Fakulti Farmasi, Universiti Kebangsaan Malaysia. Ekstrak *Gynura procumbens* ditimbang dan dilarutkan dalam 1 mL air suling untuk setiap tikus sebagai keperluan suplemen setiap hari. Larutan ini digoncang dengan menggunakan vortek dan direndam dalam mandian air pada suhu 40 °C untuk menghasilkan larutan ekstrak yang sehati. Larutan ekstrak *Gynura procumbens* diberikan kepada tikus secara oral setiap hari mengikut dos yang ditetapkan selama 24 minggu. Atorvastatin (ATV) adalah kawalan positif kajian ini (Yang et al. 2005). Pengiraan dos *Gynura procumbens* dan ATV dilakukan berdasarkan formula berikut:

$$Pengiraan = \left( \frac{\text{dos } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)}{1000 \left(\frac{\text{mL}}{\text{kg}}\right)} \times \text{berat tikus } (g) \right) \quad \dots(3.3)$$

### 3.3.6 Pengambilan Sampel Darah

Darah diambil pada awal kajian dan setiap bulan selama 6 bulan melalui sinus orbital menggunakan tiub kapilari hematokrit. Tikus dipengsanakan dengan dietil eter di dalam desikator. Darah diambil sebanyak 6 mL daripada kedua-dua belah mata dan dimasukkan ke dalam tiub biasa dan tiub mengandungi heparin yang bertindak sebagai agen antikoagulan. Kemudian, tiub tersebut diemparkan pada kelajuan 1000 x g selama 10 minit pada suhu 4 °C untuk mendapatkan serum dan plasma daripada darah. Serum, eritrosit dan plasma diasingkan serta dialiquot ke dalam tiub dengan label dan disimpan pada suhu -80 °C sehingga digunakan untuk analisis seterusnya.

### 3.3.7 Pengukuran Berat Badan Tikus Kajian

Berat badan tikus ditentukan pada awal kajian, bulan ke-3 dan bulan ke-6 dengan menggunakan alat penimbang digital. Perubahan berat badan tikus juga ditentukan dengan cara menolak berat selepas diberi suplemen *Gynura procumbens* dan statin dengan berat badan sebelum diberi suplemen *Gynura procumbens* dan statin untuk mendapatkan gambaran perubahan berat badan tikus dengan lebih jelas. Perubahan sifat fizikal dan pertumbuhan tikus juga diperhatikan dengan teliti di sepanjang kajian.

### 3.3.8 Pengukuran Tekanan Darah Tikus Kajian

Tekanan darah sistolik diukur melalui teknik kuf ekor menggunakan sistem data PowerLab pada tikus dalam keadaan sedar. Tekanan darah sistolik merupakan tekanan tertinggi di dalam arteri yang berlaku pada hujung kiraan kardiak ketika ventrikel mengecut. Sebelum pengukuran dimulakan, tikus dijemur di bawah cahaya matahari selama lima hingga 10 minit untuk meningkatkan pengaliran darah pada ekor tikus supaya pengukuran tekanan darah dapat dilakukan dengan cepat dan tepat. Apabila keadaan tikus mula stabil, tikus dimasukkan ke dalam bekas penahan yang diketatkan supaya tikus tidak boleh bergerak. Semasa bacaan tekanan darah sistolik diambil,

bagian kepala tikus ditutupi dengan satu tuala untuk menghalang penglihatannya. Hal ini dapat menenangkan emosi tikus supaya nilai tekanan darah tidak dipengaruhi oleh faktor-faktor lain. Sejumlah lima bacaan tekanan darah diambil dan nilai puratanya dikira.

### **3.4 PENGUKURAN PARAMETER BLOKIMIA**

#### **3.4.1 Penentuan Morfometri Aorta Menggunakan Pewarnaan Verhoeff van Gieson**

Tisu aorta yang digunakan untuk pewarnaan Verhoeff van Gieson (VvG) melalui proses *dewaxing* dan hidrasi seperti yang dilakukan untuk pewarnaan H&E. Penyediaan larutan dan reagen disediakan mengikut protokol kit pewarnaan VvG jenama Sigma-Aldrich. Pewarnaan dimulakan dengan merendam slaid di dalam larutan fuchsin-resorcin (Elastin acc. to Weigert) selama 10 minit. Kemudian, slaid dicelup ke dalam air paip yang mengalir sebanyak empat kali diikuti dengan larutan pewarnaan Weigert's hematoksilin iron selama 5 minit untuk proses pembezaan. Selepas itu, slaid dicelup ke dalam air paip mengalir selama satu minit sebelum pewarnaan kedua dilakukan menggunakan larutan picrofuchsin (acc. to van Gieson).

Seterusnya proses dihidrasi dilakukan dengan merendam slaid dalam etanol dengan kepekatan 70% I, 70% II, 96% I, 96% II, 100% I dan 100% II secara berturutan. Selepas dihidrasi, slaid diklarifikasi dengan larutan xylene selama 5 minit. Akhirnya, proses pelekapan dilakukan dengan melekapkan penutup slaid atas titisan larutan DPX pada slaid. Penutup slaid diletakkan pada slaid dengan berhati-hati untuk mengelakkan gelembung udara terperangkap di bawah penutup slaid. Slaid dibiarkan kering pada suhu bilik untuk semalaman. Pemeriksaan mikroskopi dilakukan dengan menggunakan mikroskop beza jelas fasa dengan pembesaran 4X, 10X, 20X dan 40X.

#### **3.4.2 Penentuan Titik Lipid Aorta Menggunakan Pewarnaan Minyak Merah O**

Tisu aorta untuk pewarnaan minyak red O (ORO) dibersihkan dan dipotong bersaiz 2 cm dan ditenam dalam acuan yang berisi sebatian suhu pemotongan optimum (Somani et al.). Blok OCT tisu aorta dibiarkan membeku dan dihiris pada ketebalan 10  $\mu$ m dalam cryostat dan dikekalkan pada suhu -20 °C. Blok OCT tisu aorta yang dihiris dilekapkan

pada slaid kaca bersih sebelum diwarnakan dengan minyak red O. Slaid dibilas di dalam 2-propanol 60% selama 3 menit dan kemudian direndam dalam minyak red O yang di telah dicairkan dengan air miliQ pada suhu 37 °C selama 40 menit. Kemudian, ia direndam semula dalam 2-propanol 60% selama 6 menit. Proses pelekapan dilakukan dengan melekapkan penutup slaid atas titisan larutan DPX pada slaid. Pemeriksaan mikroskopi dilakukan dengan menggunakan mikroskop beza jelas fasa dengan pembesaran 4X, 10X, 20X dan 40X.

### **3.4.3 Penentuan Ujian Fungsi Hepar dan Ginjal Tikus Pascamenopaus**

Ujian fungsi bagi hepar dan ginjal dalam serum dihantar ke makmal patologi untuk menjalankan analisis biokimia ujian fungsi hepar (LFT) dan ujian fungsi ginjal (RFT). LFT dinilai dengan pengukuran parameter biokimia seperti jumlah protein, albumin, globulin, bilirubin, aspartat aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) dan alkali fosfatase (Van Buul et al.), (Salimi et al. 2018; Larbie et al. 2019). Manakala bagi ujian fungsi ginjal pula, pengukuran parameter biokimia seperti urea, asid urik, kreatinine, anggaran kadar penurasan glomerular (eGFR), urea nitrogen darah (BUN) dan kalsium diukur. Sebanyak 20 µL sampel serum digunakan bagi setiap analit biokimia yang diuji.

### **3.4.4 Profil Lipid Tikus Pascamenopaus**

#### **a. Triasilgliserol Jumlah**

Aras triasilgliserol jumlah (TG) dalam serum ditentukan mengikut protokol yang disediakan oleh pengeluar kit jenama EnzyChrome. Sebanyak 10 µL sampel serum dan 10 µL piawai rujukan diisi dalam telaga berasingan pada plat mikrotiter 96 telaga. Campuran reagen kerja yang terdiri daripada 100 µL larutan penimbang asai, 2 µL campuran enzim, 5 µL larutan lipase, 1 µL ATP dan 1 µL pewarna reagen ditambah ke dalam setiap telaga yang berisi sampel serum dan piawai rujukan masing-masing sebanyak 100 µL. Plat telaga diketuk supaya campuran reagen bercampur dengan sekata. Kemudian plat telaga dieram pada suhu 37 °C selama 30 minut. Bacaan penyerapan pada 570 nm diambil menggunakan mesin pembaca ELISA.

**b. Kolesterol Jumlah**

Aras kolesterol jumlah (TC) dalam serum ditentukan mengikut protokol yang disediakan oleh pengeluar kit jenama EnzyChrome. Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  sampel serum dan 50  $\mu\text{L}$  piawai rujukan diisi dalam telaga berasingan pada plat telaga. Larutan cair NAD yang terdiri daripada campuran 40  $\mu\text{L}$  larutan penimbal asai dan 18  $\mu\text{L}$  larutan NAD dipindahkan ke dalam telaga yang berisi sampel serum dan piawai sebanyak 50  $\mu\text{L}$  bagi setiap telaga. Plat telaga diketuk supaya campuran reagen bercampur dengan sekata dan dibiarkan selama 5 minit pada suhu bilik sebelum bacaan penyerapan latar belakang diambil pada 340 nm.

Larutan cair enzim yang terdiri daripada campuran 10  $\mu\text{L}$  larutan penimbal asai dan 1  $\mu\text{L}$  campuran enzim dipindahkan ke dalam telaga yang berisi sampel serum dan piawai sebanyak 10  $\mu\text{L}$  bagi setiap telaga. Plat telaga diketuk supaya campuran reagen bercampur dengan sekata dan dibiarkan selama 30 minit. Bacaan penyerapan pada 340 nm diambil menggunakan mesin pembaca ELISA.

**c. Kolesterol-Lipoprotein Berketumpatan Rendah dan Tinggi**

Aras serum kolesterol-lipoprotein berketumpatan rendah (LDL) dan kolesterol-lipoprotein berketumpatan tinggi (HDL) ditentukan mengikut protokol yang disediakan oleh pengeluar kit jenama EnzyChrome. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  sampel serum diisi ke dalam tiub 1.5 mL yang berisi 20  $\mu\text{L}$  reagen pemendakan. Campuran kedua-dua larutan digoncang menggunakan vorteks dan diempar pada 9500 x g selama lima minit. Kemudian, sebanyak 24  $\mu\text{L}$  supernatan yang terhasil dipindahkan ke dalam tiub bersih yang berisi 96  $\mu\text{L}$  larutan penimbal asai tanpa menyentuh pelet yang terbentuk pada dasar tiub. Tiub campuran supernatan dan larutan penimbal asai dilabel sebagai HDL. Kemudian, tiub yang mengandungi pelet sahaja ditambah dengan 40  $\mu\text{L}$  larutan salina fosfat penimbal (PBS) dan dicampur dengan menggunakan pipet. Campuran pelet dan PBS sebanyak 24  $\mu\text{L}$  dipindahkan ke dalam tiub bersih yang berisi 96  $\mu\text{L}$  larutan penimbal asai dan dilabel sebagai LDL. Seterusnya, campuran 12  $\mu\text{L}$  sampel serum dan 108  $\mu\text{L}$  dan larutan penimbal asai dipindah ke dalam tiub bersih yang baru. Tiub ini dilabel sebagai total. Piawai kolesterol juga disediakan dengan mencampurkan 5  $\mu\text{L}$

stok kolesterol (300 mg/dL) dan 145  $\mu$ L larutan penimbang asai dan tiub dilabel sebagai *standard*.

Tindak balas dimulakan dengan memindahkan 50  $\mu$ L larutan penimbang asai (blank), 50  $\mu$ L larutan dari tiub *standard*, 50  $\mu$ L larutan dari tiub total, 50  $\mu$ L larutan dari tiub HDL dan 50  $\mu$ L larutan dari tiub LDL ke dalam setiap telaga secara berasingan pada plat telaga. Untuk setiap telaga, sebanyak 50  $\mu$ L larutan kerja yang terdiri daripada campuran 55  $\mu$ L larutan penimbang asai, 1  $\mu$ L campuran enzim dan 1  $\mu$ L reagen pewarna ditambah. Plat telaga diketuk supaya campuran reagen bercampur dengan sekata dan dieram selama 30 minit pada suhu bilik sebelum bacaan penyerapan latar belakang diambil pada 570 nm.

#### **3.4.5 Penentuan Aras Malondialdehid Plasma Tikus Menopaus**

Aras malondialdehid (MDA) dalam plasma diukur dengan menggunakan HPLC berdasarkan tindak balas MDA dengan 2,4-dinitrophenilhidrazin (DNPH) (Pilz et al. 2000). Lengkung piawai MDA disediakan terlebih dahulu dengan skala kepekatan 10-50  $\mu$ M. Stok piawai disediakan dengan mencampurkan 12.5  $\mu$ L TEP dengan 50 ml larutan 1 % asid sulfurik dan dieram semalaman pada suhu 4  $^{\circ}$ C.

Sebanyak 50  $\mu$ L larutan piawai dan sampel plasma dipindahkan ke dalam tiub mikroempar baru dan 200  $\mu$ L 1.3 M NaOH ditambah dan divortek selama 5 saat. Larutan kemudian dieram pada suhu 60  $^{\circ}$ C selama 60 minit. Selepas itu, semua tiub disejukkan di dalam ais selama 5 minit sebelum dicampur dengan 100  $\mu$ L 35 % asid perklorik bagi tujuan pemendakan protein. Larutan kemudian diempar pada kelajuan 10,000 x g pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama 10 minit. Sebanyak 300  $\mu$ L supernatan diasingkan ke dalam tiub mikroempar baru dan 12.5  $\mu$ L 5 mM DNPH dimasukkan sebelum dieram pada suhu bilik selama 30 minit dalam ruang gelap. Larutan kemudian dituras dengan menggunakan penuras picagari 0.45  $\mu$ m sebelum dimasukkan ke dalam tiub eppendorf. Akhir sekali, sebanyak 40  $\mu$ L larutan supernatan disuntik ke dalam sistem HPLC.

Analisis HPLC dilakukan dengan menggunakan Sistem Perisian Kromatografik Shimadzu versi Class-VP 6.1 LC Workstation dengan pengesan foto diod atur (PDA) dan dilengkapi dengan penyuntik automatik serta beroperasi pada 310 nm pada 150 mm

× 3.9 mm, 5 µm alphaBond C18. Sampel dan piawai dielut dengan fasa mobil yang mengandungi 380 ml asetonitril, 620 ml air MilliQ®, 0.2% (v/v) asid asetik dan dinyah gas pada kadar aliran 0.6 ml/min. Tahap MDA plasma dikira daripada keluk piawai yang disediakan melalui hidrolisis berasid 1,1,3,3- tetraetoksipropana (TEP). Pengiraan kepekatan MDA dilakukan menurut formula berikut:

$$\boxed{\text{Kepekatan MDA plasma} \left( \frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right) = \text{Kuantiti MDA HPLC} \times V_t V_s} \quad \dots(3.4)$$

$V_t$  = jumlah isipadu campuran (312.5 µL)

$V_s$  = isipadu sampel (50 µL)

### 3.4.6 Penentuan Aktiviti Enzim Antioksidan Eritrosit

#### a. Katalase

Aktiviti katalase (CAT) dalam eritrosit ditentukan mengikut protokol yang disediakan oleh pengeluar kit jenama Cayman. Asai ini diukur berdasarkan aktiviti CAT melalui tindak balas katalase (CAT) terlibat dalam detoksifikasi hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), spesies oksigen reaktif (ROS), yang merupakan produk toksik daripada kedua-dua metabolisme aerobik biasa dan pengeluaran ROS patogenik. Enzim ini mempercepat penukaran dua molekul  $\text{H}_2\text{O}_2$  kepada oksigen molekul dan dua molekul air (aktiviti pemangkin).

Tindak balas dimulakan dengan menambah 20 µL larutan hidrogen peroksida ke dalam semua plat telaga yang digunakan. Plat ditutup dengan plastik dan dieram di dalam penggoncang selama 20 minit pada suhu bilik. Seterusnya, 30 µL kalium hidroksida diisi ke dalam setiap telaga untuk menghentikan tindak balas diikuti dengan penambahan 30 µL larutan purpald ke dalam semua telaga. Sekali lagi plat ditutup, diletakkan di atas penggoncang dan dieram selama 10 minit. Akhir sekali, sebanyak 10 µL kalium periodat ditambah ke dalam semua perigi sebelum plat ditutup dan dieram di atas penggoncang selama 5 minit pada suhu bilik. Kemudian bacaan penyerapan pada 540 nm diambil menggunakan mesin pembaca ELISA. Satu unit enzim didefinisikan

sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1.0 nmol formaldehid per menit pada 25°C. Pengiraan aktiviti enzim CAT dilakukan menurut formula berikut:

$$\text{Aktiviti CAT} = \frac{\text{sampel} \times \mu\text{M}}{20 \text{ min} \times \text{faktor pencairan sampel}} = \frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \quad \dots(3.5)$$

#### b. Glutation Peroksidase

Aktiviti glutathion peroksidase (GPx) dalam eritrosit ditentukan mengikut protokol yang disediakan oleh pengeluar kit jenama Cayman. Asai ini diukur berdasarkan aktiviti GPx melalui tindak balas berpasangan glutathion reduktase. GSSG yang terhasil daripada penurunan hidroperoksida oleh GPx ini dikitar semula menjadi GSH dengan menggunakan glutathion reduktase (GSSG-R) dan NADPH.

Tindak balas dimulakan dengan penambahan 20 µl kumena hidroperoksida ke dalam semua telaga yang digunakan. Masa dicatat dengan tepat sejeurus tindak balas dimulakan. Plat digoncang secara berhati-hati selama beberapa saat untuk campuran sempurna. Penyerapan dibaca setiap satu minit menggunakan spektrofotometer bacaan plat asai rantaian enzim imunisorben (ELISA) model VersaMax selama 5 minit pada 340 nm untuk mendapatkan sekurang-nya 5 titik masa.

Untuk pengiraan, perubahan penyerapan ( $\Delta A_{340}$ ) per minit ditentukan dengan memplotkan nilai penyerapan sebagai fungsi masa untuk mendapatkan kecerunan (kadar) garis lurus dalam graf untuk telaga tidak berenzim. Setelah itu, kadar  $\Delta A_{340}/\text{min}$  daripada sampel ditolak dengan nilai di atas. Untuk menentukan aktiviti GPx, formula di bawah digunakan. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mengakibatkan pengoksidaan 1.0 nmol NADPH kepada NADP<sup>+</sup> per minit pada 25°C.

$$\text{Aktiviti GPx} = \frac{\Delta A_{340}}{\text{min} \times 0.19 \text{ mL} \times \text{faktor pencairan sampel}} = \frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} - 0.00373 \mu\text{M} - 1 \quad \dots(3.6)$$

### c. Superoksida Dismutase

Aktiviti superoksida dismutase (SOD) dalam eritrosit ditentukan mengikut protokol yang disediakan oleh pengeluar kit jenama Cayman. Asai ini diukur berdasarkan aktiviti SOD menggunakan sistem xanthine / xanthine oxidase (XOD) untuk menghasilkan anion superoksida dan kromagen untuk menghasilkan pewarna formazan yang larut dalam air setelah pengurangan anion superoksida. Aktiviti superoxide dismutase ditentukan melalui penghambatan atau pengurangan kromagen.

Tindak balas dimulakan dengan menambah 20  $\mu$ L larutan xantina oksida secepat mungkin ke dalam semua plat telaga yang digunakan. Setelah itu, plat ditutup dengan penutup plastik dan plat digoncang secara perlahan selama beberapa saat untuk mencampur reagen di dalam plat telaga. Seterusnya plat dieram pada suhu 25 °C dengan mod goncang selama 30 minit. Plat dibaca pada penyerapan 450 nm dengan menggunakan mesin pembaca ELISA. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menunjukkan dismutasi 50% terhadap radikal superoksida. Pengiraan aktiviti enzim SOD dilakukan menurut formula berikut:

$$\begin{aligned} & \left[ \text{Aktiviti SOD} \left( \frac{U}{ml} \right) \right] \dots(3.7) \\ & = \left( \frac{\text{sampel (LR)} - \text{pintasan y}}{\text{kecerunan}} \right) \times \frac{0.23}{0.01} \text{ mL} \times \text{faktor pencairan sampel} \end{aligned}$$

#### 3.4.7 Reaktiviti Vaskular

Cecincin aorta diproses mengikut kaedah daripada kajian lepas (Ajay & Mustafa 2006). Segmen aorta sepanjang 5 mm direndam di dalam 25 mL mandian organ yang dipenuhi dengan larutan Kreb's. Komposisi larutan Kreb's adalah seperti Jadual 3.1 dan dikekalkan pada suhu 37 °C dengan campuran gas oksigen (95%) dan karbon dioksida (5%) yang dialirkan ke dalam larutan Kreb's. Regangan cecincin aorta (g) direkodkan menggunakan penderia-anjakan. Cecincin aorta diimbangkan kepada tekanan asas 1 g selama 30 minit. Sepanjang waktu ini, larutan Kreb's ditukar setiap 15 minit. Selepas proses keseimbangan ini, kajian reaktiviti vaskular dimulakan dengan menentukan

tindak balas vasokonstriksi kepada larutan isotonik KCl berkepekatan 80 mM. Keadaan ini dikenali sebagai fasa penyeimbangan.

Selepas fasa penyeimbangan dilakukan, cecincin aorta dibilas dengan larutan Krebs's untuk menyingkirkan kesan larutan KCl tadi. Seterusnya, keutuhan endotelium pada cecincin aorta diuji dengan menambah larutan PE ke dalam larutan Krebs's pada kepekatan  $10^{-7}$  M untuk melihat tindak balas vasokonstriksi diikuti dengan larutan Ach ( $10^{-5}$  M) untuk melihat tindak balas relaksasi pada cecincin aorta. Hanya aorta yang merekodkan peratusan tindak balas relaksasi melebihi 50% sahaja yang akan digunakan untuk analisis reaktiviti vaskular.

Cecincin aorta yang berbeza digunakan untuk setiap eksperimen yang berlainan. Eksperimen dibahagikan kepada dua bahagian. Pertama, peningkatan kepekatan secara kumulatif tindak balas relaksasi aruhan Ach ( $10^{-6}$  M hingga  $10^{-10}$  M) atau SNP ( $10^{-6}$  M hingga  $10^{-10}$  M) ditambahkan ke dalam cecincin aorta yang telah dikonstriksikan dengan larutan PE pada kepekatan  $10^{-6}$  M. Lengkok kepekatan-tindak balas diplotkan sebagai peratusan relaksasi aorta terhadap vasodilasi maksimum pada kepekatan PE  $10^{-6}$  M. Kedua, peningkatan kepekatan secara kumulatif tindak balas vasodilasi aruhan PE dari  $10^{-6}$  M hingga  $10^{-10}$  M. Tindak balas cecincin aorta dinyatakan sebagai peratusan maksimum vasodilasi aruhan PE berbanding dengan vasodilasi aruhan  $K^+$  tinggi.

Dadah yang dipilih untuk kajian reaktiviti vaskular adalah asetilkolin (Ach), fenilferin (PE) dan natrium nitroprusida (SNP). Kepekatan asal setiap dadah yang dibekalkan adalah  $1 \times 10^{-1}$  M. Teknik pencairan bersiri diguna untuk menyediakan dadah dengan kepekatan diantara  $10^{-1}$  M hingga  $10^{-10}$  M. Untuk menyediakan kepekatan  $1 \times 10^{-2}$  M (PE  $10^{-2}$ ), sebanyak 10  $\mu$ L PE  $10^{-1}$  diletakkan di dalam tiub ependorf diikuti dengan 90  $\mu$ L air suling. Bagi kepekatan  $1 \times 10^{-3}$  M (PE  $10^{-3}$ ), sebanyak 10  $\mu$ L PE  $10^{-2}$  M diletakkan di dalam tiub ependorf diikuti dengan 90  $\mu$ L air suling. Teknik pencairan tersebut diteruskan sehingga mencapai kepekatan  $1 \times 10^{-10}$  M (PE  $10^{-10}$ ). Teknik serupa digunakan untuk mencairkan kepekatan larutan Ach dan SNP. Semua bahan kimia kecuali  $CaCl_2$  ditimbang mengikut sukatan seperti dalam dan dilarutkan dalam bikar yang berisi 900 mL air suling lalu dipanaskan di atas plat panas sambil dikacau dengan

seimbang menggunakan rod magnet.  $\text{CaCl}_2$  dilarutkan terlebih dahulu dalam 50 mL air suling untuk mengelakkan larutan menjadi keruh. Akhir sekali, isipadu larutan digenapkan kepada 1 L menggunakan kelalang kon.

Jadual 3.1 Komposisi larutan Kreb's

Larutan	Kemolaran (mM)	Berat bahan (g)
NaCl	118.0	6950
$\text{NaHCO}_3$	25.0	2100
$\text{MgSO}_4$	1.2	290
KCl	4.7	350
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.2	140
Glukosa	11.7	2000
$\text{CaCl}_2$	2.5	350

### 3.4.8 Penentuan Aras Nitrik Oksida Plasma Tikus Menopaus

Aras nitrik oksida diukur berdasarkan kepada pengukuran aras nitrit dalam plasma. Ion nitrit dalam plasma bertindak balas melalui diazotisasi dengan reagen Griess untuk membentuk garam diazonium yang kemudian bertindak balas dengan N- (1-naftil) etilenediamin dalam tindak balas gandingan azo untuk membentuk pewarna azo merah jambu. Untuk menyediakan stok larutan iaitu 100  $\mu\text{mol}$  larutan nitrit, sebanyak 0.0035 g natrium nitrit dicampurkan dengan 500 mL air suling. Kepekatan larutan nitrit yang berlainan disediakan mengikut julat penyerapan sampel seperti Jadual 3.2 berikut.

Jadual 3.2 Kepekatan larutan piawai mengikut julat penyerapan sampel

Kepekatan ( $\mu\text{mol}$ )	Larutan stok ( $\mu\text{L}$ )	Isipadu air ( $\mu\text{L}$ )
2.5	2.5	97.5
5	5	95
10	10	90
20	20	80
40	40	60
60	60	40
80	80	20
100	100	0

Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  larutan piawai rujukan atau sampel plasma diletakkan di dalam telaga-telaga sampel pada plat mikrotiter 96 telaga. Kemudian diikuti dengan penambahan 50  $\mu\text{L}$  reagen Griess. Pengeraman dilakukan selama 15 minit pada suhu

bilik dalam keadaan gelap dan akhirnya kepekatan nitrik diukur pada panjang gelombang 540 nm menggunakan Emax ELISA pembaca mikroplat. Kepekatan nitrik ditentukan berdasarkan kepada lengkung piawai natrium nitrit.

### **3.4.9 Penentuan Aras Nitrik Oksida Sintase Jenis Endotelium Plasma**

Penentuan aktiviti nitrik oksida sintase jenis Endotelium (eNOS) dalam plasma mengikut protokol yang disediakan oleh pengedar kit jenama Elabscience. Kit ELISA ini menggunakan prinsip Sandwich-ELISA. Plat telaga yang disediakan dilapisi dengan antibodi khusus. Gabungan piawai atau sampel plasma dengan antibodi spesifik bertindak balas dengan antibodi pengesanan biotinilasi dan avidin-horseradish peroxidase (HRP) membentuk larutan berwarna biru. Tindak balas enzim-substrat kemudian bertukar warna kuning diukur secara spektrofotometrik. Sebanyak 100  $\mu$ L sampel plasma dan piawai diisi di dalam plat telaga menggunakan mikropipet dan dieram selama 90 minit pada suhu 37 °C. Kemudian, sampel dan piawai dikeluarkan dari plat telaga dan diisi dengan 100  $\mu$ L antibodi pengesanan biotinil ke dalam setiap telaga dan dieram selama 60 minit pada suhu 37 °C.

Seterusnya, antibodi pengesanan biotinil dikeluarkan dan plat telaga dicuci dengan larutan salina penimbal fosfat (PBS) sebanyak tiga kali. Kemudian, sebanyak 100  $\mu$ L konjugat HRP diisi ke dalam setiap telaga dan dieram selama 30 minit pada suhu 37 °C. Selepas tamat waktu pengeraman, konjugat HRP dikeluarkan dan plat telaga dicuci dengan PBS sebanyak lima kali diikuti dengan pengeraman dengan reagen substrat sebanyak 90  $\mu$ L dalam setiap plat telaga selama 15 minit pada suhu yang sama. Tindak balas dihentikan dengan menambah 50  $\mu$ L larutan berhenti ke dalam setiap plat telaga. Bacaan penyerapan pada 450 nm diambil menggunakan mesin pembaca ELISA.

### **3.4.10 Penentuan Aras Nitrik Oksida Sintase Jenis Induksi Plasma**

Penentuan aktiviti nitrik oksida sintase jenis induksi dalam plasma mengikut protokol yang disediakan oleh pengedar kit jenama Elabscience. Kit ELISA ini menggunakan prinsip Sandwich-ELISA. Plat telaga yang disediakan dilapisi dengan antibodi khusus. Gabungan piawai atau sampel plasma dengan antibodi spesifik bertindak balas dengan

antibodi pengesanan biotinilasi dan avidin-horseradish peroxidase (HRP) membentuk larutan berwarna biru. Tindak balas enzim-substrat kemudian bertukar warna kuning diukur secara spektrofotometrik. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  sampel plasma dan piawai diisi di dalam plat telaga menggunakan mikropipet dan dieram selama 90 minit pada suhu 37  $^{\circ}\text{C}$ . Kemudian, sampel dan piawai dikeluarkan dari plat telaga dan diisi dengan 100  $\mu\text{L}$  antibodi pengesanan biotinil ke dalam setiap telaga dan dieram selama 60 minit pada suhu 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Selepas 1 jam, antibodi pengesanan biotinil dikeluarkan dan plat telaga dicuci dengan salina penimbal fosfat (PBS) sebanyak tiga kali. Kemudian, sebanyak 100  $\mu\text{L}$  konjugat HRP diisi ke dalam setiap telaga dan dieram selama 30 minit pada suhu 37  $^{\circ}\text{C}$ . Selepas tamat waktu pengeraman, konjugat HRP dikeluarkan dan plat telaga dicuci dengan PBS sebanyak lima kali diikuti dengan pengeraman dengan reagen substrat sebanyak 90  $\mu\text{L}$  dalam setiap plat telaga selama 15 minit pada suhu yang sama. Tindak balas dihentikan dengan menambah 50  $\mu\text{L}$  larutan berhenti ke dalam setiap plat telaga. Bacaan penyerapan pada 450 nm diambil menggunakan mesin pembaca ELISA.

#### **3.4.11 Penentuan Isyarat Vaskular Endotelium Aorta**

Isyarat vaskular Endotelium plasma iaitu molekul lekatan vaskular terlarut-1 (sVCAM-1) dan molekul lekatan intersel terlarut-1 (sICAM-1) ditentukan mengikut protokol yang disediakan oleh pengedar kit jenama Elabscience. Kit ELISA ini menggunakan prinsip Sandwich-ELISA. Plat telaga yang disediakan dilapisi dengan antibodi khusus. Gabungan piawai atau sampel plasma dengan antibodi spesifik bertindak balas dengan antibodi pengesanan biotinilasi dan avidin-horseradish peroxidase (HRP) membentuk larutan berwarna biru. Tindak balas enzim-substrat kemudian bertukar warna kuning diukur secara spektrofotometrik. Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  sampel plasma dan piawai diisi di dalam plat telaga menggunakan mikropipet. Sampel dan piawai dieram selama 90 minit pada suhu 37  $^{\circ}\text{C}$ . Kemudian, sampel dan piawai dikeluarkan dari plat telaga dan diisi dengan 100  $\mu\text{L}$  antibodi pengesanan biotinil ke dalam setiap telaga dan dieram selama 60 minit pada suhu 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Seterusnya, antibodi pengesan biotinil dikelarkan dari setiap telaga dan plat telaga dicuci dengan larutan salina penimbal fosfat (PBS) sebanyak tiga kali. Kemudian, sebanyak 100  $\mu\text{L}$  konjugat HRP diisi ke dalam setiap telaga dan dieram selama 30 minit pada suhu 37 °C. Selepas tamat waktu penderaman, konjugat HRP dikeluarkan dan plat telaga dicuci dengan PBS sebanyak lima kali diikuti dengan penderaman dengan reagen substrat sebanyak 90  $\mu\text{L}$  dalam setiap plat telaga selama 15 minit pada suhu yang sama. Tindak balas dihentikan dengan menambah sebanyak 50  $\mu\text{L}$  larutan berhenti ke dalam setiap plat telaga. Akhir sekali, bacaan penyerapan pada 450 nm diambil menggunakan mesin pembaca ELISA.

### **3.5 ANALISIS METABOLOMIK AORTA**

#### **3.5.1 Homogenisasi Tisu Aorta**

Sampel tisu aorta dibiarkan menyahsejuk beku di atas ais dan dibersihkan dengan 1 mL PBS selepas dikeluarkan daripada peti penyimpanan -80 °C. Sampel aorta dibekukan dengan cecair nitrogen dan dihancurkan. Setiap 10 mg sampel aorta, perlu ditambah 500  $\mu\text{L}$  metanol 80% sejuk dan diikuti dengan proses homogenisasi menggunakan sonikator pada tetapan 30 amplitud (amp). Sampel yang dihomogenisasi dicampurkan pula dengan cecair kloroform sejuk dan digetarkan selama 30 saat pada suhu 4°C dan diemparkan pada kelajuan 20000 daya pengemparan relatif (rcf) selama 10 minit pada suhu 4 °C. Supernatan yang terhasil dipindahkan ke tiub bersih dan dikeringkan selama tiga jam menggunakan pengering bervakum. Sampel tersebut disimpan di dalam peti penyimpanan -80 °C sehingga digunakan untuk analisis LC-MS.

#### **3.5.2 Rekonstitusi Sampel**

Sampel ekstrak metabolit daripada homogenat tisu aorta yang telah dikeringkan dikeluarkan daripada peti penyimpanan -80 °C. Untuk setiap 10 mg tisu aorta, perlu ditambah dengan 200  $\mu\text{L}$  metanol 20% sejuk dan digetarkan untuk melarutkan semula metabolit kering pada dasar tiub. Larutan tersebut ditapis menggunakan penapis picagari lalu diisi ke dalam tiub sisip gelas. Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  larutan disuntik ke dalam sistem LC-MS.

### 3.5.3 Kromatografi Cecair-Spektrometri Jisim (LC-MS) Tidak Bersasar

Semua pelarut yang digunakan adalah bergred MS. Proses kromatografi dijalankan menggunakan sistem UHPLC digandingkan dengan MS yang mengandungi prob pengionan elektro-sembruran dipanaskan (HESI-II). Sistem tersebut telah dikawal dengan perisian Chromeleon Xpress dan sistem data MS Thermo Xcalibur™ (versi 4.0). Pemisahan kromatografi dilakukan dengan menggunakan kolum fasa berbalik model Synchronis™ C18, 100 mm panjang × 2.1 mm diameter, saiz zarah 1.7 mm pada suhu 55 °C dengan isipadu suntikan 2 µL untuk setiap sampel (triplikat). Suhu penyampel auto dikekalkan pada 10 °C dan sampel disuntik secara rawak.

Pelarut dialirkan pada kadar 0.45 mL/min menggunakan air (pelarut A) dan asetonitril (pelarut B) di mana kedua-duanya mengandungi asid formik 0.1% (v/v). Program kecerunan elusi bagi tempoh 15 minit ditetapkan seperti berikut: 0 min, 0.5% B; 5.5 min, 50% B; 6-12 min, 98% B; 13-15 min, 0.5% B. Mod pengionan positif dan negatif digunakan seperti berikut: Kadar aliran gas salutan pada 50 unit arbitrari (AU), kadar aliran gas auksiliari pada 18 AU, kadar aliran gas sapuan pada 0 AU, suhu kapilari pada 320 °C dan voltan semburan pada 3.5 kV bagi mod positif atau 3.0 kV bagi mod negatif. Spektrum MS telah diimbas menggunakan kaedah MS/data bergantung MS2 (TopN) (dd-MS2), di mana MS2 dicetuskan apabila ion berintensiti tinggi dikesan dalam imbasan MS penuh.

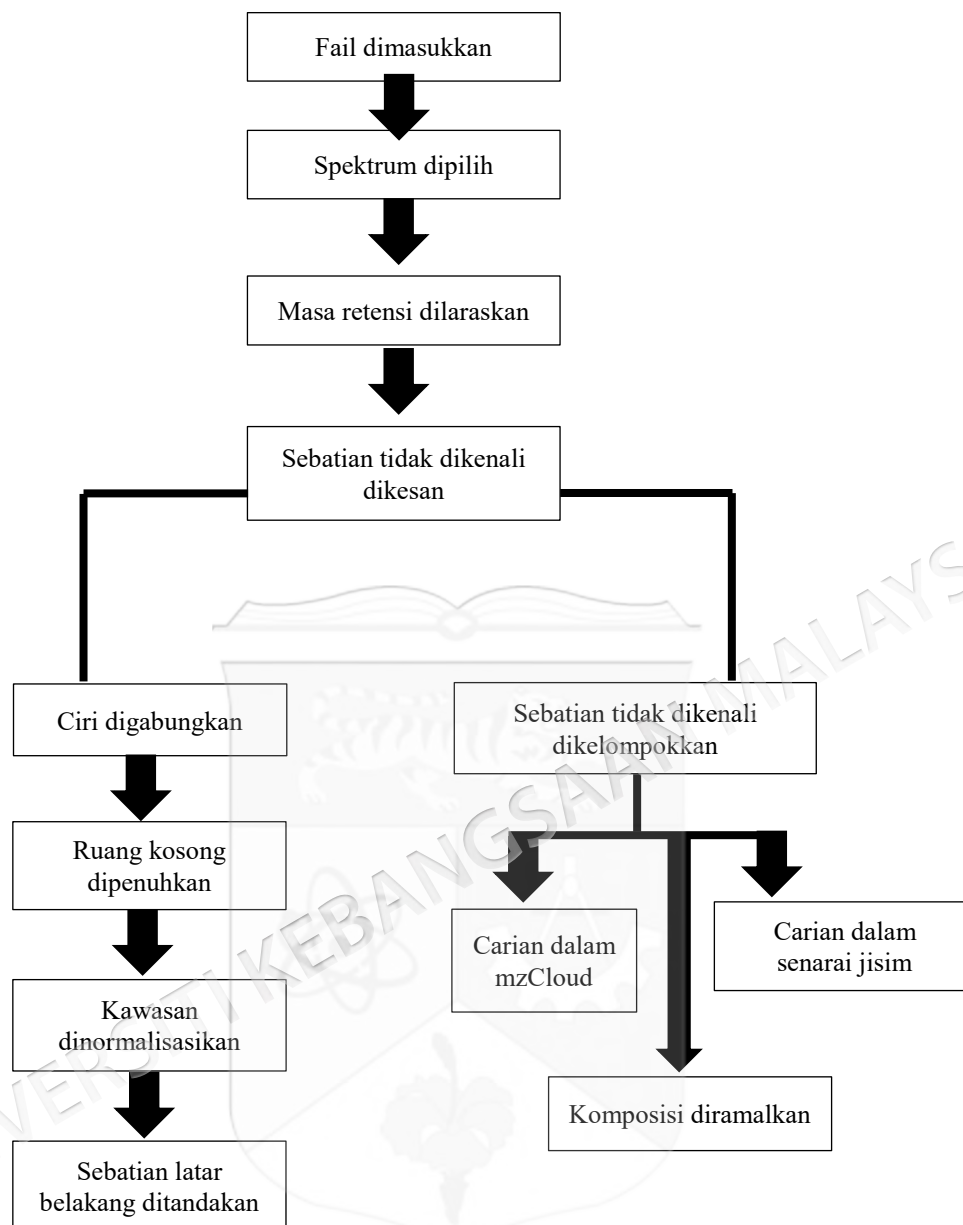
Parameter bagi imbasan MS penuh: Keadaan caj lalai ialah 1, ketetapan peleraian pada 60000 resolusi, kawalan kenaikan automatik (AGC) pada  $1e6$ , tempoh suntikan (IT) maksimum pada 120 ms dengan julat imbasan 100-1000  $m/z$ . Parameter bagi imbasan dd-MS2: Ketetapan peleraian pada 15 000 resolusi, sasaran AGC pada  $5e4$ , IT maksimum pada 50 ms, kiraan lingkaran 5, TopN 5, jendela pengasingan pada 1.5  $m/z$ , julat imbasan 200-2000  $m/z$  dan tenaga pertembungan bertingkat dinormalkan pada 20, 40 dan 60.

Tetapan bagi dd adalah seperti berikut: Sasaran minimum AGC pada  $8e2$ , ambang keamatan pada  $1.6e^4$ , disertai pengecualian isotop dan pengecualian dinamik pada 10 s. Sistem MS dikalibrasikan dengan menggunakan Pierce LTQ ESI Positive Ion dan Pierce LTQ ESI Negative Ion Calibration Solutions (Thermo Scientific).

Kawalan kualiti (QC) dilakukan di mana isipadu yang sama daripada setiap sampel telah dicampurkan bagi menilai kebolehulangan dan kebolehpercayaan dapatan sistem LC-MS. Sampel QC tersebut disuntik sebanyak tiga kali sebelum analisis sampel individu dan diulangi selepas setiap enam larian sampel.

**a. Pra-Pemprosesan Data**

Fail data “.RAW” diproses dengan perisian Thermo Scientific Compound Discoverer™ 2.0 (CD 2.0) menggunakan aliran kerja tanpa sasaran (Rajah 3.3). Aliran kerja ini telah menggunakan nod “*Detect Unknown Compounds*” untuk mencari puncak kromatografi bagi sebatian tidak dikenali [berat molekul (MW) × masa retensi (RT)] dan nod “*Predict Composition*” untuk menentukan kemungkinan komposisi elemen yang membentuk sebatian tersebut. Selain itu, aliran kerja tersebut turut membuat pencarian dalam pangkalan data *mzCloud* dan *ChemSpider* untuk mengenal pasti sebatian tidak dikenali yang telah dikesan oleh sistem LC-MS. Data yang telah dipra-proses ini kemudiannya dieksport kepada fail “.xlsx” untuk analisis statistik seterusnya.

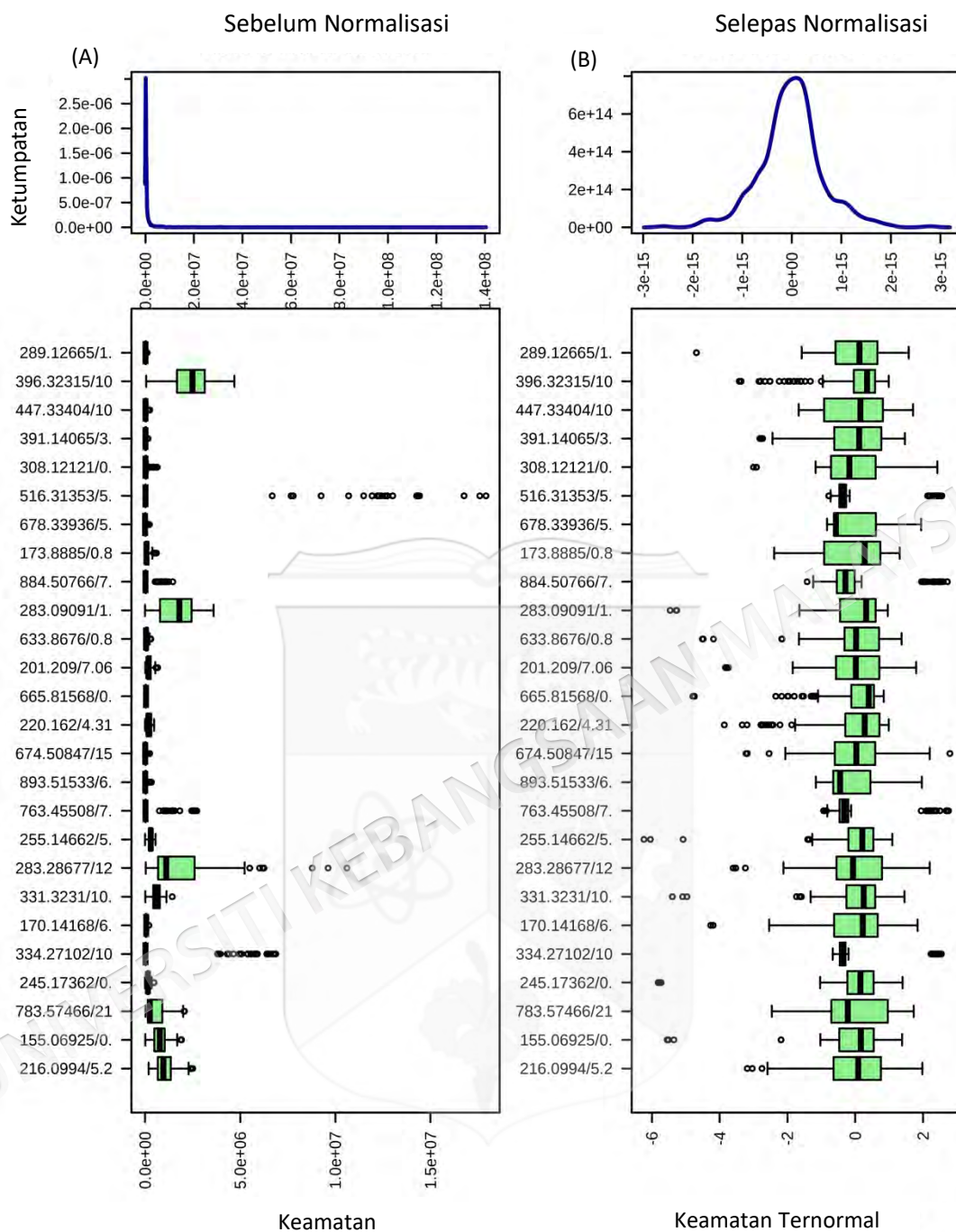


Rajah 3.3 Aliran kerja untuk pemprosesan data dengan perisian Thermo Scientific Compound Discoverer™ 2.0 (CD 2.0)

## b. Analisis Multivariat

Data kawasan puncak bagi metabolit yang dikesan telah dianalisis menggunakan modul “*Statistical Analysis*” dalam perisian MetaboAnalyst 4.0 atas talian di laman sesawang <http://www.metaboanalyst.ca/> (Chong et al. 2018). Data tersebut menjalani beberapa proses normalisasi: (1) Normalisasi kuantil untuk menjadikan taburan data bagi kumpulan yang berbeza lebih seiras, (2) Transformasi kuasa tiga untuk menghampirkan taburan data tersebut kepada taburan normal, dan (3) Pengketengahan purata untuk menghilangkan data *offset* serta memfokuskan kepada perbezaan dan bukan persamaan dalam setiap pembolehubah. Langkah normalisasi ini dilaksanakan agar data untuk setiap kumpulan tikus dapat dibuat perbandingan dengan lebih mudah (Rajah 3.4).

Bagi penilaian awal kualiti data, kaedah multivariat menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA) tanpa penyeliaan telah dilakukan diikuti dengan *Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis* (OPLS-DA). Dalam analisis OPLS-DA, kovarians di antara X dan Y dimaksimumkan untuk mengenal pasti metabolit yang menyebabkan pemisahan antara kumpulan tikus dalam kajian ini. Seterusnya, ujian permutasi dibuat untuk melihat kesignifikan pemisahan antara kumpulan dengan nilai  $p$  ditetapkan pada atau kurang daripada 0.05. Metabolit berpotensi seterusnya dipilih apabila nilai *Variable Importance in Projection* (VIP) melebihi 1.0 (Durani et al. 2017).



Rajah 3.4 Taburan data metabolomik sebelum proses normalisasi (A) dan selepas normalisasi (B). Data menjalani normalisasi kuantil, transformasi punca kuasa tiga dan pengketengahan purata supaya perbandingan antara kumpulan dapat dijalankan dengan lebih mudah

### c. Identifikasi Metabolit

Metabolit yang dikesan oleh LC-MS dan disenarai pendek (analisis multivariat: ujian permutasi  $< 0.05$  dan analisis FC  $> 2$ ) dikenal pasti dengan cara menyemak silang pada pangkalan data *Metlin Library* dan *Human Metabolome Database* (HMDB) dengan ketepatan jisim ditetapkan pada 5 ppm. Pangkalan data atas talian ini mempunyai pautan pada *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), PubChem,, LIPID MAPS® dan ChEBI. Metabolit sangkaan (putatif) ini kemudiannya disahkan dengan cara membandingkan spektrum MS/MS bagi metabolit tersebut dengan pangkalan data spektrum jisim *mzCloud* atas talian yang terpaut pada perisian CD 2.0 atau di laman sesawangnya (<https://www.mzcloud.org/>) sebelum digunakan untuk analisis seterusnya.

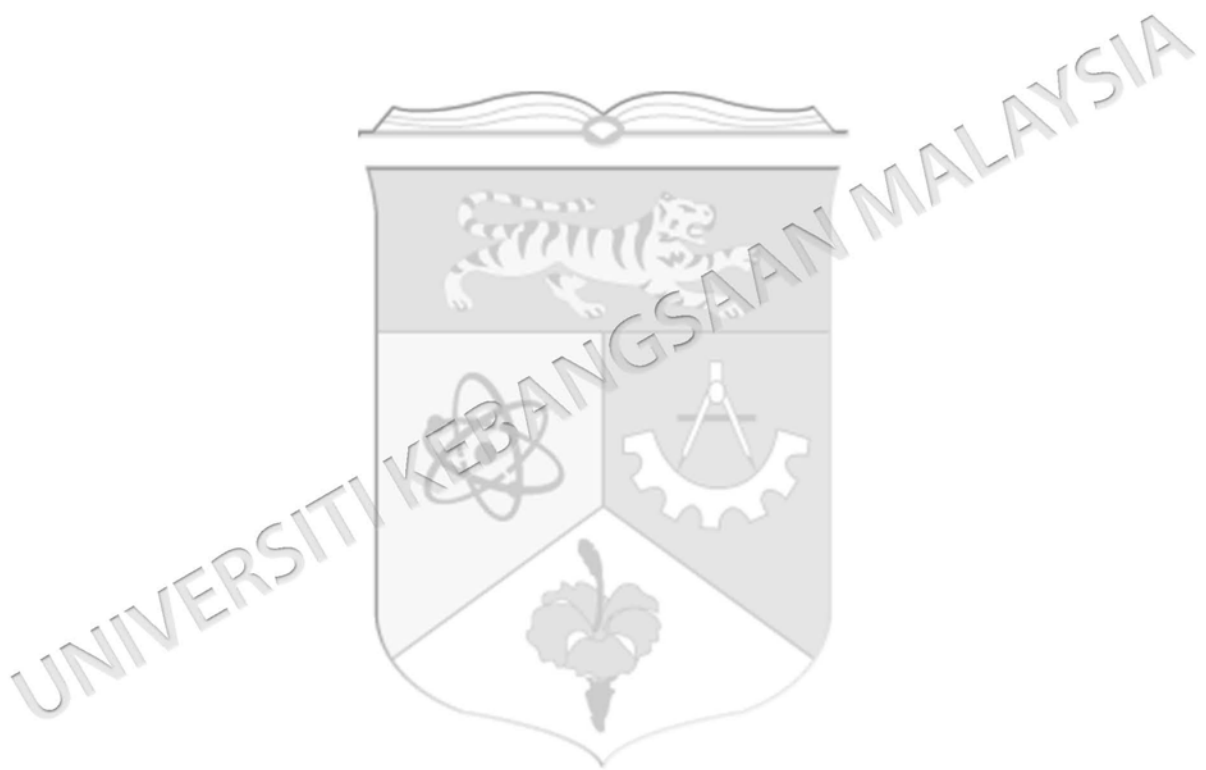
### d. Analisis Tapak Jalan Metabolik

Metabolit yang dikenal pasti seterusnya dianalisis menggunakan fungsi “*Pathway Analysis*” dalam perisian *MetaboAnalyst 4.0* untuk mendapatkan gambaran lebih jelas tapak jalan yang mengalami gangguan dalam tikus pascamenopaus, tikus pascamenopaus yang disuplementasi GP dan ATV (kumpulan PM250GP, PM500GP dan PMATV). Perpustakaan metabolit untuk *Rattus norvegicus* dipilih bagi proses pemetaan. Algoritma untuk analisis tapak jalan pula dibuat menggunakan “*Fischer Exact Test*” untuk analisis over-representasi manakala “*Relative-betweenness Centrality*” dipilih untuk analisis topologi tapak jalan. Laluan metabolik dengan nilai impak menghampiri atau melebihi 0.1 dianggap sebagai tapak jalan paling relevan (Durani et al. 2017).

## 3.6 ANALISIS STATISTIK

Perisian *IBM Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) versi 23.0. Kenormalan data diuji menggunakan Kolmogrov Smirnov. Perbezaan antara kumpulan kajian ditentukan dengan menggunakan analisis varians (ANOVA) diikuti dengan ujian Tukey HSD. Ujian tekanan darah, berat badan dan reaktiviti vaskular ditentukan dengan *Repeated Measure ANOVA* dan *Singel Effect Analysis*. Kesemua data

dinyatakan dalam bentuk nilai purata  $\pm$  purata ralat piawai (SEM). Keputusan adalah signifikan jika  $p < 0.05$ .



## BAB IV

### HASIL KAJIAN

#### 4.1 KOMPONEN BIOAKTIF EKSTRAK 80% ETANOL *GYNURA PROCUMBENS*

Komponen bioaktif yang dikenalpasti dalam ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* berdasarkan masa penahanan hasil sebatian dan puncak ion molekul ditunjukkan dalam Jadual 4.1. Jumlah ion dalam kromatogram cecair spektrum jisim (LCMS) bagi komponen bioaktif dalam ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* ditunjukkan dalam Rajah 4.1.

Jadual 4.1 Masa tahanan (RT) dan puncak ion molekul komponen bioaktif yang dikenalpasti dalam ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens*

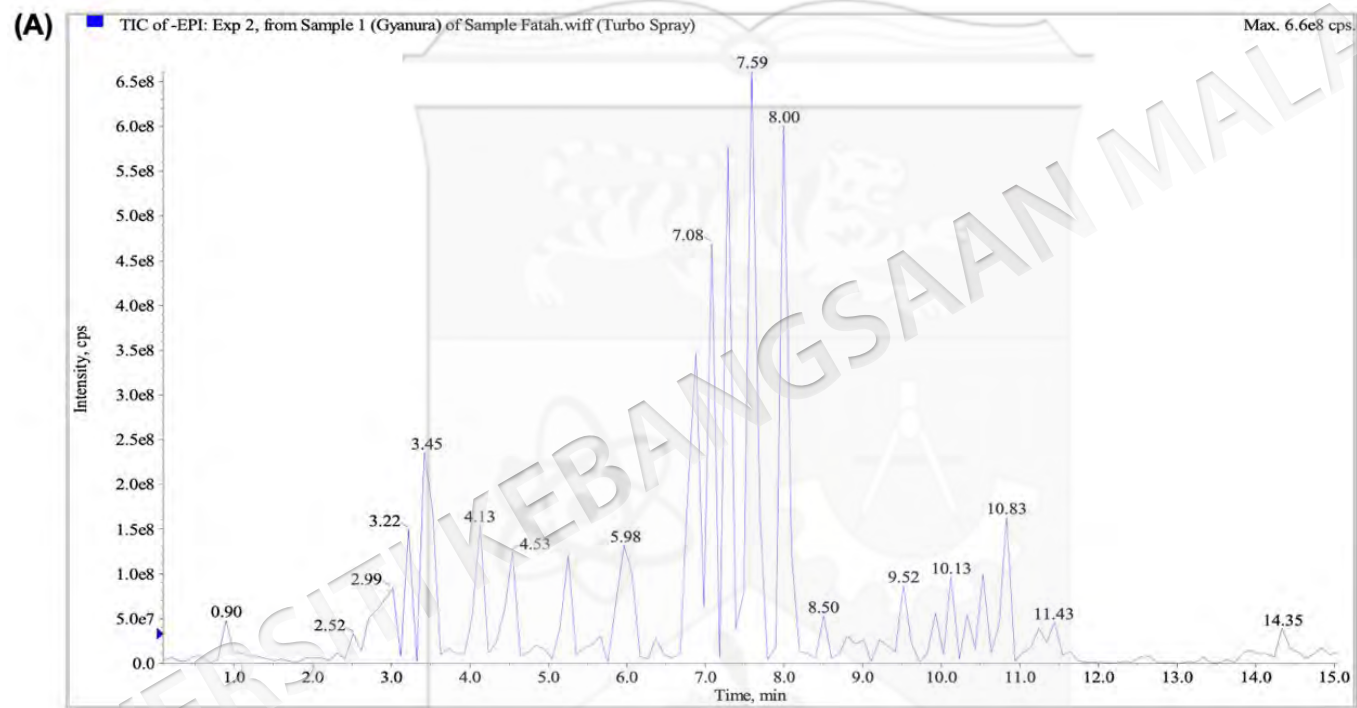
Metabolit sekunder	RT (min)	Puncak ion molekul [M-H] <sup>-</sup> (m/z)
1.Tidak dikenal pasti	0.9	244.990
2.Asid kafik	-	179.030
3.Asid trimitil galik glusuronida	-	387.000
4.Asid 5-O-(E)-kafeol- galaktarik	4.13	371.000
5.Asid klorogenik	4.33	609.520
6.Tidak dikenal pasti	4.53	496.190
7.Rutin	4.81	609.160
8.Kuersertin	4.91	300.923
9.Asid neoklorogenik	4.99	-
10.Nikotiflorin	5.02	593.000
11.Astragalin	5.12	447.000
12.Kaempferol	5.79	284.916
13.Asid 4-O metil galik sulfat / asid 3-O methyl galik sulfat	-	263.070
14.Asid oxooktadekanoik isomer	-	298.170
15.Tidak dikenal pasti	5.98	-
16.Genkwanin isomer	-	572.290
17.Eriositrin	-	595.280

bersambung...

...sambungan		
18.Asid 15,16-dihidroksi-9Z,12Z oktadekadienoik	7.08	311.200
19.Tidak dikenal pasti	7.59	-
20.Asid oksooktadekanoik terturun	-	312.190
21.Asid oxooktadekanoik	9.52	297.300
22.Tidak dikenal pasti	10.83	817.000

---





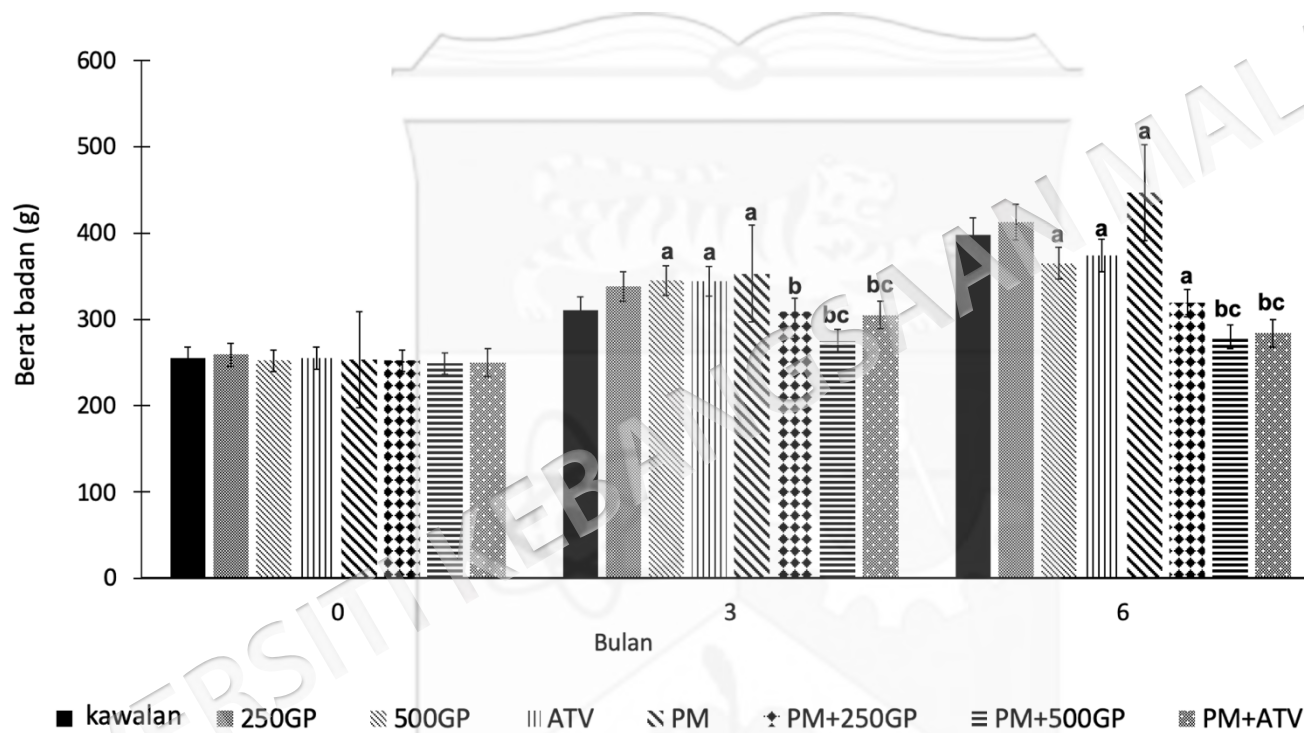
Rajah 4.1 Kromatogram penuh LCMS ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens*

#### 4.2 BERAT BADAN TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

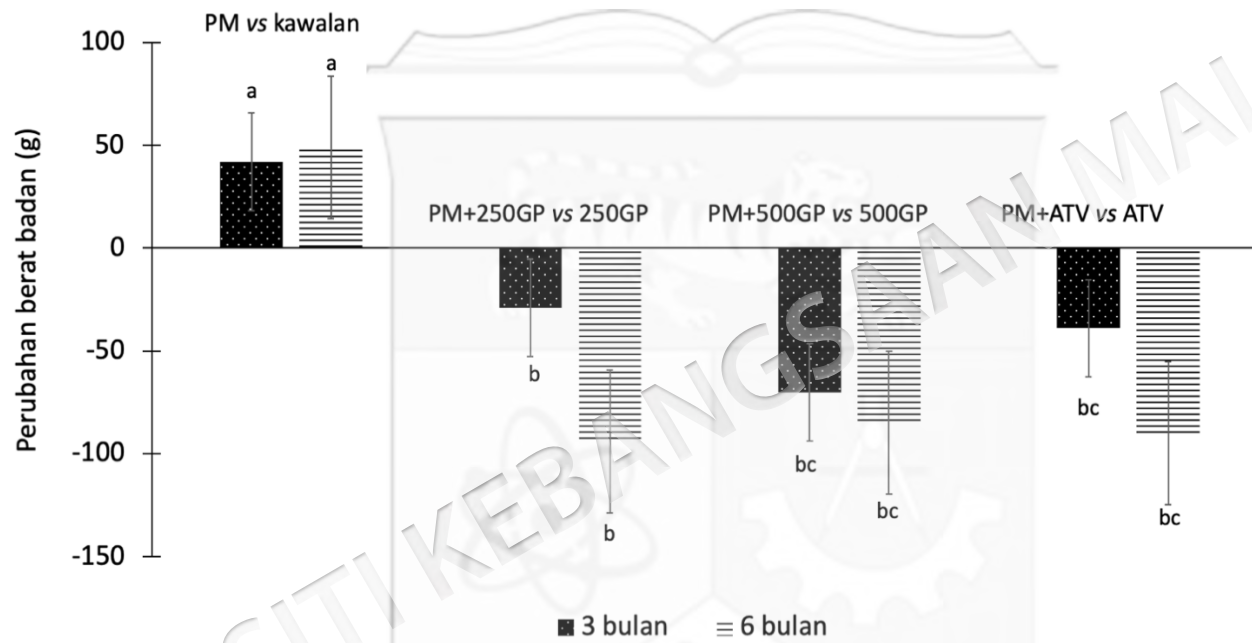
Berat badan tikus yang disuplementasi ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* ditunjukkan pada Rajah 4.2. Berat badan basal setiap kumpulan adalah serupa. Terdapat peningkatan berat badan bagi kumpulan sham pada bulan ke-3 dan ke-6. Berat badan kumpulan yang disuplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg (bulan ke-3 dan ke-6) meningkat dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan kawalan. Walau bagaimanapun, terdapat penurunan berat badan yang signifikan bagi kumpulan 500GP pada bulan ke-6 berbanding kumpulan kawalan.

Bagi kumpulan pascamenopaus, kumpulan PM menunjukkan peningkatan berat badan yang signifikan ( $p < 0.05$ ) pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Kumpulan PM+250GP dan PM+500GP didapati mengalami penurunan berat badan yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6 dengan suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* (dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg). Kumpulan pascamenopaus yang menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) juga menunjukkan penurunan berat badan yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM dan PM+250GP pada bulan ke-3 dan ke-6.

Perubahan berat badan tikus kumpulan PM berbanding kumpulan kawalan didapati meningkat secara signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan kawalan pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan pascamenopaus yang diberi suplementasi *Gynura procumbens* (dos 250 dan 500 mg/kg) dan atovarstatin didapati mengalami kehilangan berat badan yang ketara berbanding dengan kumpulan PM (Rajah 4.3).



Rajah 4.2 Kesan suplementasi ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap berat tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

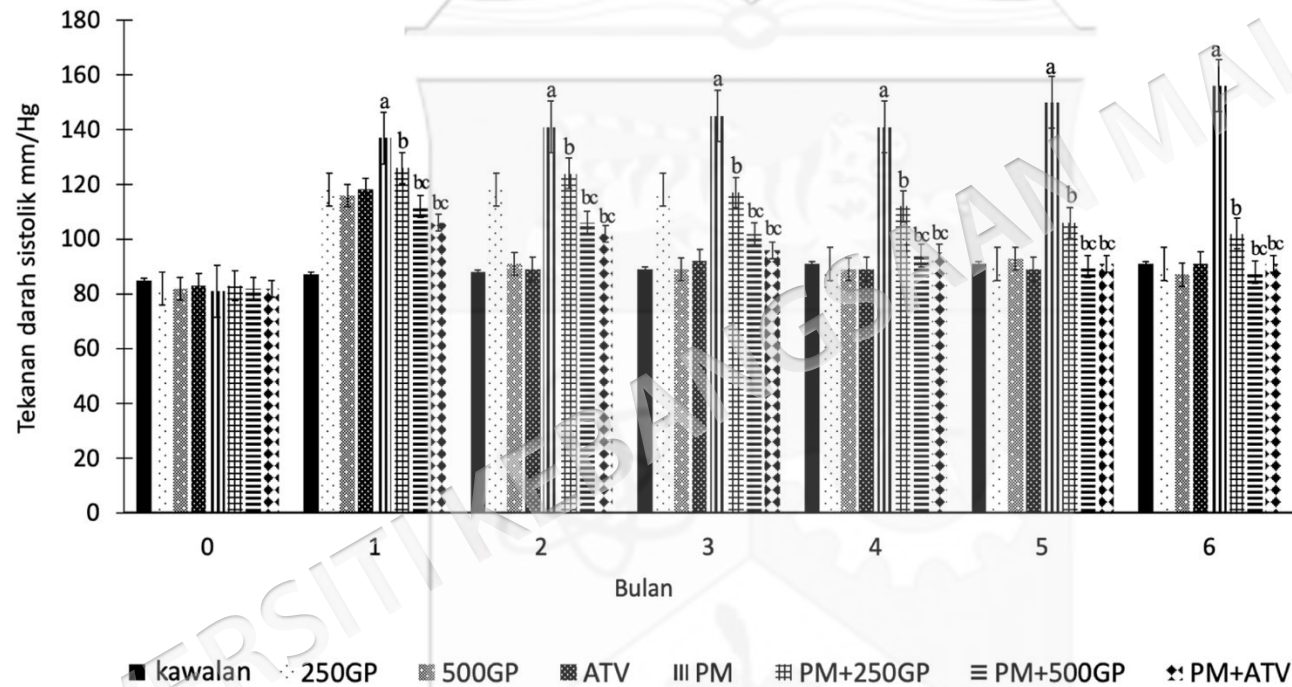


Rajah 4.3 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap berat badan tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.3 TEKINAN DARAH SISTOLIK TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

Tekanan darah sistolik tikus diambil setiap bulan selama 6 bulan (Rajah 4.4). Di permulaan kajian didapati tekanan darah sistolik bagi setiap kumpulan berada pada julat yang normal dan tiada perbezaan ditunjukkan. Tekanan darah sistolik kumpulan sham yang menerima suplemen *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg didapati meningkat di bulan pertama hingga bulan ke-3 berbanding kumpulan kawalan tetapi mengalami sedikit penurunan bermula pada bulan ke-4 hingga akhir kajian berbanding kawalan. Tiada perubahan yang ketara didapati pada tekanan darah sistolik kumpulan 500GP yang menerima suplemen ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 500 mg/kg dan ATV (dos 10 mg/kg) berbanding kawalan pada bulan ke-2 hingga akhir kajian.

Bagi kumpulan PM menunjukkan peningkatan signifikan ( $p < 0.05$ ) tekanan darah sistolik pada bulan pertama sehingga bulan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Tekanan darah sistolik diturunkan ( $p < 0.05$ ) dengan pemberian suplemen ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg (PM+250GP) dan 500 mg/kg (PM+500GP) berbanding kumpulan PM pada bulan pertama sehingga bulan ke-6. Pemberian atorvastatin ke atas kumpulan pascamenopaus (PM+ATV) juga menurunkan tekanan darah sistolik dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM dan PM+250GP.

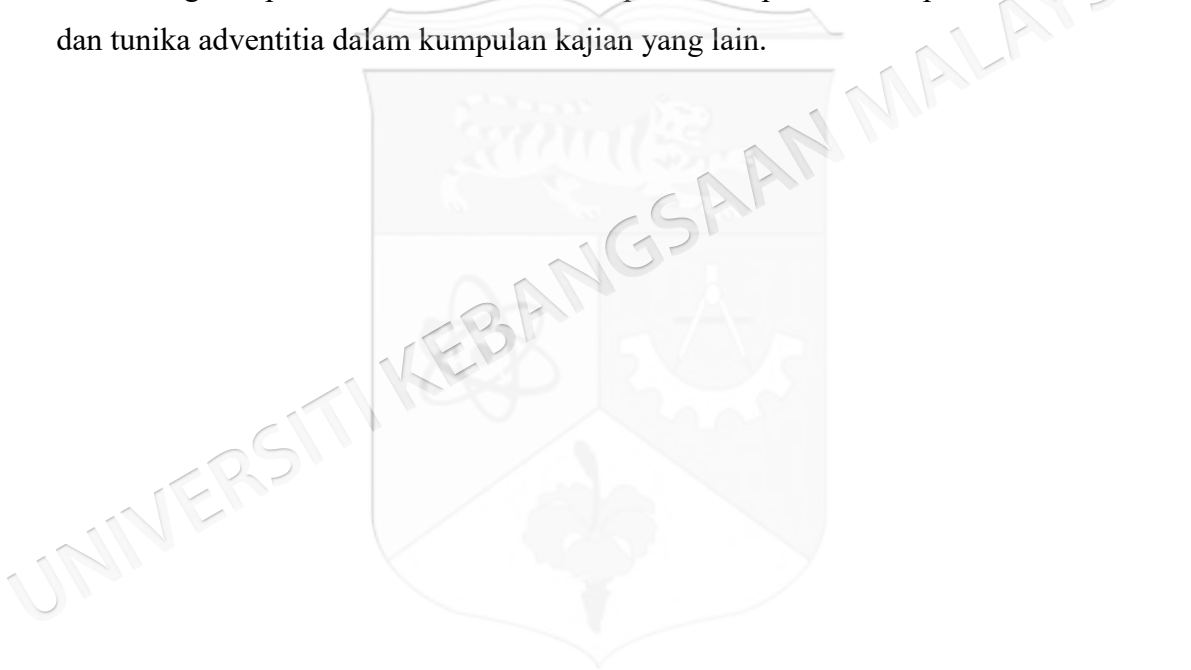


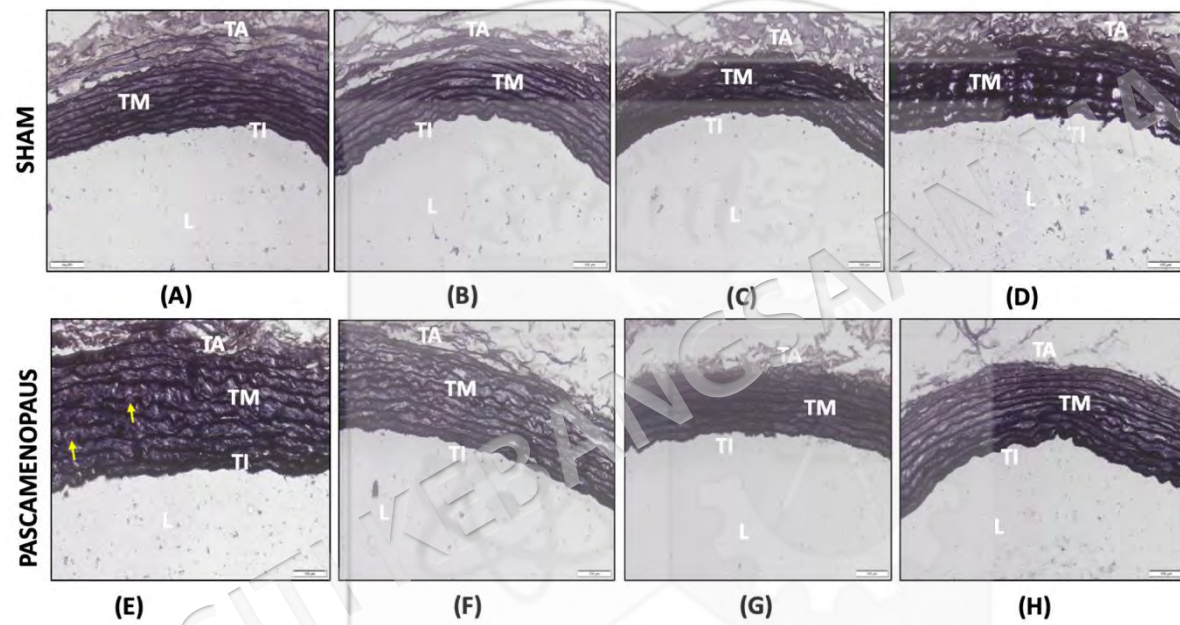
Rajah 4.4 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap tekanan darah sistolik tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). a perbezaan signifikan berbanding kawalan, b perbezaan signifikan berbanding PM dan c perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### **4.4 KAJIAN MORFOLOGI TISU AORTA TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK**

##### **4.4.1 Tisu Aorta dengan Pewarnaan Verhoeff van Gieson**

Tisu aorta diwarnakan dengan pewarnaan Verhoeff van Gieson (VvG) (Rajah 4.5) untuk melihat struktur serat elastik. Penggunaan pewarnaan VvG memberikan serat elastik yang diwarnai hitam dapat dilihat dengan jelas dan serat kolagen pula diwarnai biru atau keunguan. Tisu aorta yang diwarnakan dengan pewarna VvG (Fotomikrograf 4.7A-H) menunjukkan sel endotelium yang jelas terletak berhampiran dengan lamina elastik dalaman (IEC). Tunika intima tisu aorta kumpulan PM didapati menebal berbanding kumpulan sham manakala tiada perbezaan penebalan lapisan tunika media dan tunika adventitia dalam kumpulan kajian yang lain.



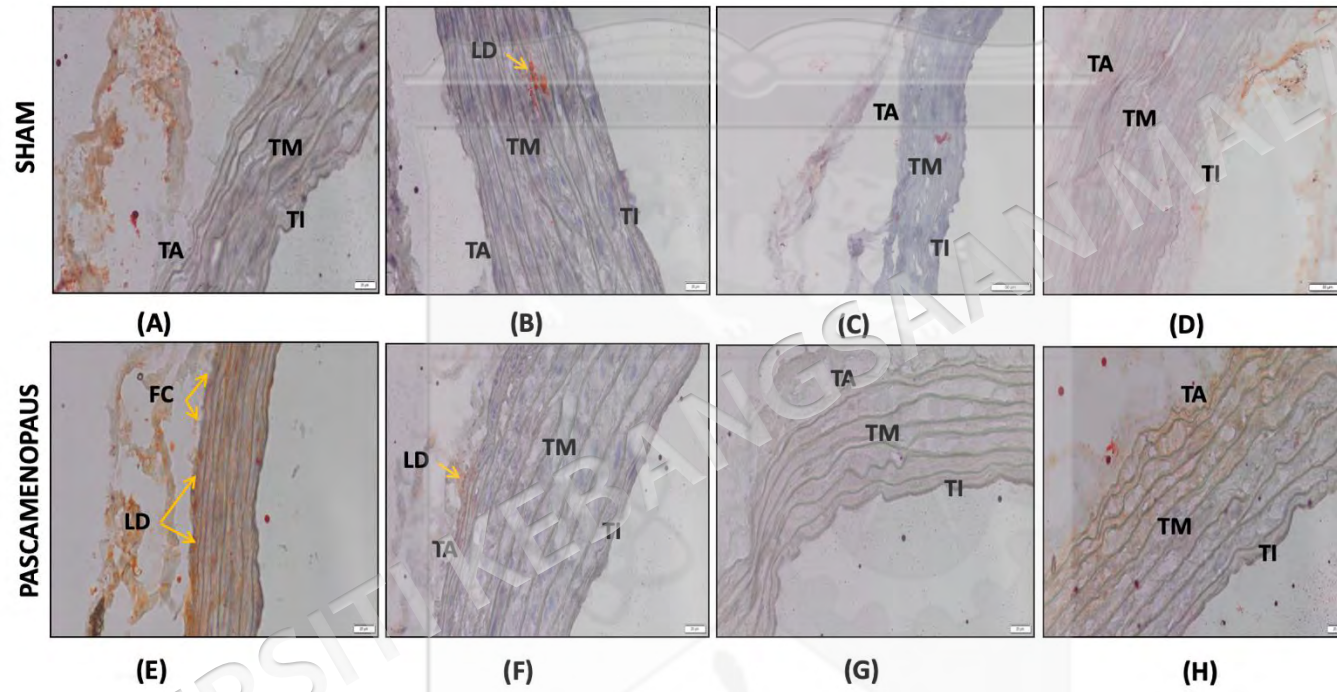


Rajah 4.5 Fotomikrograf tisu aorta dengan pewarnaan VvG bagi kumpulan (A) kawalan, (B) 250GP, (C) 500GP, (D) ATV, (E) PM, (F) PM+250GP, (G) PM+500GP dan (H) PM+ATV pada pemerhatian mikroskop di bawah pembesaran magnifikasi X40

#### 4.4.2 Tisu Aorta dengan Pewarnaan Minyak Merah O

Tisu aorta diwarnakan dengan pewarnaan minyak merah O (ORO) untuk melihat pembentukan titik lipid (LD) atau kolesterol pada bahagian tunika media (Rajah 4.6). Pewarnaan ORO memperlihatkan LD bewarna jingga. Pembentukan LD menyebabkan penebalan pada tunika media (TM) aorta kumpulan PM dan menghasilkan sel busa (FC) pada bahagian tunika intima (TI). Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg (Fotomikrograf 4.6F dan G) serta atovarstatin pada dos 10 mg/kg (Fotomikrograf 4.6H) ke atas tisu aorta kumpulan PM mengurangkan jumlah LD dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM (Fotomikrograf 4.6E).





Rajah 4.6 Fotomikrograf tisu aorta dengan pewarnaan ORO bagi kumpulan (A) kawalan, (B) 250GP, (C) 500GP, (D) ATV, (E) PM, (F) PM+250GP, (G) PM+500GP dan (H) PM+ATV pada pemerhatian mikroskop di bawah pembesaran magnifikasi X40

#### 4.5 KAJIAN HISTOMORFOMETRIK TISU AORTA TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

Jadual 4.2 menunjukkan ukuran bahagian aorta termasuk ketebalan intima-media (IMT), luas intima-media (IMA) dan diameter lumen tikus kumpulan sham dan PM. IMT aorta kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan berbanding kumpulan kawalan. IMT aorta kumpulan PM menunjukkan peningkatan dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) IMT aorta kepada  $148.78 \pm 3.31 \mu\text{M}$  berbanding kumpulan kawalan ( $53.25 \mu\text{M} \pm 3.2$ ). Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan IMT aorta kumpulan PM masing-masing  $101.28 \pm 3.4 \mu\text{M}$  dan  $93.91 \pm 2.93 \mu\text{M}$  dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM. Pemberian atorvastatin pada dos 10 mg/kg turut menurunkan ketebalan intima-media kumpulan PM+ATV ( $106.48 \pm 2.71 \mu\text{M}$ ) berbanding PM.

IMA aorta kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan berbanding kumpulan kawalan. IMA aorta kumpulan PM menunjukkan peningkatan dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) kepada  $1.09 \pm 0.02 \text{ mm}^2$  berbanding kumpulan kawalan ( $0.32 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ ). Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg meningkatkan IMA aorta kumpulan PM masing-masing  $0.65 \pm 0.07 \text{ mm}^2$  dan  $0.63 \pm 0.05 \text{ mm}^2$  dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM. Pemberian atorvastatin pada dos 10 mg/kg turut meningkatkan IMA aorta kumpulan PM+ATV ( $0.97 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ ) berbanding kumpulan PM.

Diameter lumen kumpulan sham juga tidak menunjukkan perubahan berbanding kumpulan kawalan. Kumpulan PM menunjukkan peningkatan dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) diameter lumen kepada  $1.89 \pm 0.01 \text{ mm}$  berbanding kumpulan kawalan ( $1.40 \text{ mm}$ ). Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan diameter lumen kumpulan PM masing-masing  $1.63 \pm 0.04 \text{ mm}$  dan  $1.37 \pm 0.02 \text{ mm}$  dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM. Pemberian atorvastatin pada dos 10 mg/kg turut menurunkan diameter lumen kumpulan PM+ATV ( $1.41 \pm 0.07 \text{ mm}$ ) berbanding PM.

Jadual 4.2 Ukuran ketebalan dan luas aorta serta diameter lumen bagi tikus kumpulan sham dan pascamenopaus

Kumpulan	IMT ( $\mu\text{M}$ )	IMA ( $\text{mm}^2$ )	Diameter lumen (mm)
Kawalan	53.25 $\pm$ 3.2	0.32 $\pm$ 0.02	1.40 $\pm$ 0.01
250GP	58.23 $\pm$ 3.5	0.28 $\pm$ 0.01	1.39 $\pm$ 0.04
500GP	55.26 $\pm$ 2.31	0.26 $\pm$ 0.01	1.35 $\pm$ 0.02
ATV	60.67 $\pm$ 5.2	0.30 $\pm$ 0.04	1.37 $\pm$ 0.04
PM	<sup>a</sup> 148.78 $\pm$ 3.31	<sup>a</sup> 1.09 $\pm$ 0.02	<sup>a</sup> 1.89 $\pm$ 0.01
PM+250GP	<sup>b</sup> 101.28 $\pm$ 3.4	<sup>b</sup> 0.65 $\pm$ 0.07	<sup>b</sup> 1.63 $\pm$ 0.04
PM+500GP	<sup>bc</sup> 93.91 $\pm$ 2.93	<sup>bc</sup> 0.63 $\pm$ 0.05	<sup>bc</sup> 1.37 $\pm$ 0.02
PM+ATV	<sup>c</sup> 106.48 $\pm$ 2.71	<sup>b</sup> 0.97 $\pm$ 0.04	<sup>bc</sup> 1.41 $\pm$ 0.07

#### 4.6 UJIAN FUNGSI HEPAR DAN GINJAL SERUM TIKUS MENOPAUS

Fungsi hepar diukur berdasarkan parameter biokimia seperti jumlah protein, albumin, globulin, bilirubin, alkalin fosfatase, aspartate transferase (AST), alanin transferase (ALT) dan nisbah albumin-globulin (GGT) ditunjukkan di Jadual 4.3. Manakala fungsi ginjal diuji berdasarkan parameter biokimia seperti asid urik, urea, kalsium, anggaran kadar penurasan glomerulus (eGFR) dan urea nitrogen darah (BUN) dan kreatinin ditunjukkan pada Jadual 4.4. Semua parameter biokimia dalam serum bagi kedua-dua ujian menunjukkan nilai skor tidak melebihi julat skor normal. Ini menunjukkan tiada ketoksikan pada ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap kedua-dua organ tersebut.

Jadual 4.3 Ujian fungsi hepar serum bagi tikus kumpulan sham dan PM dengan suplementasi ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* pada dos 250 dan 500 mg/kg di awal (0 bulan) dan akhir (6 bulan) kajian

Parameter biokimia	Julat skor normal (Sharp La Regina, 1998; Suckow et al., 2006)	Kumpulan															
		Kawalan		250GP		500GP		ATV		PM		PM+250GP		PM+500GP		PM+ATV	
		0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6
Jumlah protein	45-84 (g/L)	46	63	44	62	45	57	45	66	45	89	44	72	44	65	45	78
Albumin	40-48 (g/L)	43	44	43	47	43	46	43	44	43	51	43	40	44	40	44	43
Globulin	12-20 (g/dL)	12	15	12	16	12	15	12	17	12	27	12	17	12	14	12	15
Bilirubin	1.2-2.0 (mg/dL)	1.3	1.4	1.3	1.5	1.2	1.4	1.2	1.5	1.3	2.4	1.2	1.6	1.2	1.3	1.2	1.4
ALP	132-312 (U/L)	134	133	133	143	134	139	133	200	133	314	133	204	133	200	133	205
AST	77-157 (U/L)	78	88	74	79	78	80	78	81	78	163	78	127	79	121	78	130
ALT	22-224 (U/L)	95	127	99	120	94	115	95	124	125	236	96	205	94	199	95	211
GGT	0-3 (U/L)	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	3.27	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3

Jadual 4.4 Ujian fungsi ginjal serum bagi tikus kumpulan sham dan PM dengan suplementasi ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* pada dos 250 dan 500 mg/kg di awal dan akhir kajian

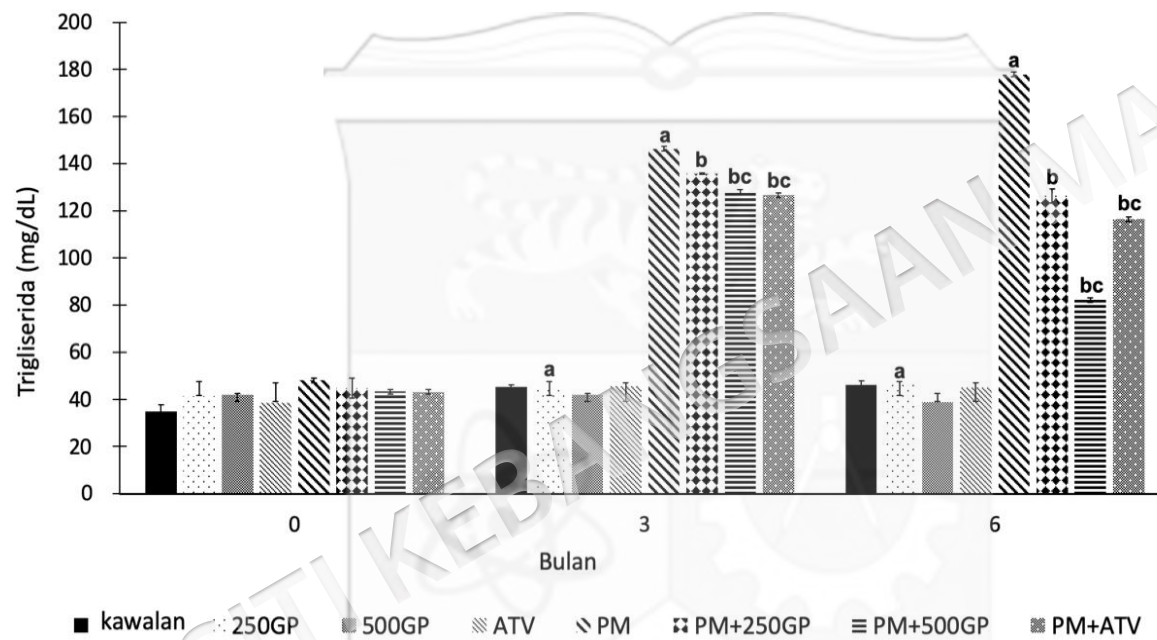
Parameter biokimia	Julat skor normal (M. Neghab, A. Mirzaei, et al, 2019 & Q. Zhao et al, 2019)	Kumpulan															
		Kawalan		250GP		500GP		ATV		PM		PM+250GP		PM+500GP		PM+ATV	
		0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6	0	6
Urea	6.4-10.4 (mmol/L)	6.5	6.7	6.5	7.5	6.5	7.2	6.5	7.6	6.5	12.3	6.6	10.2	6.5	9.7	6.5	10
Asid urik	2.4-6.0 (µmol/L)	2.7	3.1	2.7	5.5	2.5	5.3	2.7	5.4	2.7	7.2	2.7	4.9	2.7	4.5	2.7	5.6
Kreatinine	0.9-1.6 (µmol/L)	1.2	1.3	1.2	1.4	1.3	1.3	1.4	1.3	1.3	3.9	1.3	1.5	1.2	1.4	1.3	1.6
eGFR	> 90 (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	103.7	> 90	> 90	> 90	> 90	>90	> 90
BUN	8-23 (mg/dL)	10	11	10	11	10	11	10	11	10	31	10	17	10	14	10	18
Kalsium	8.6-10.6 (mmol/L)	8.8	10	8.8	10	8.9	10	8.9	10	8.9	21	8.9	10	8.9	10	8.9	10

## 4.7 PROFIL LIPID SERUM TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

### 4.7.1 Aras Triasilgliserol Jumlah Serum

Aras triasilgliserol jumlah (TG) serum kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.7). Walau bagaimanapun, aras jumlah TG kumpulan sham (250GP) yang diberi suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg menunjukkan penurunan signifikan berbanding kumpulan kawalan pada bulan ke-3 dan ke-6.

Aras triasilgliserol jumlah kumpulan PM meningkat dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras jumlah TG kumpulan PM+250GP dan PM+500GP dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras jumlah TG yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM dan PM+250GP pada bulan ke-3 dan ke-6.

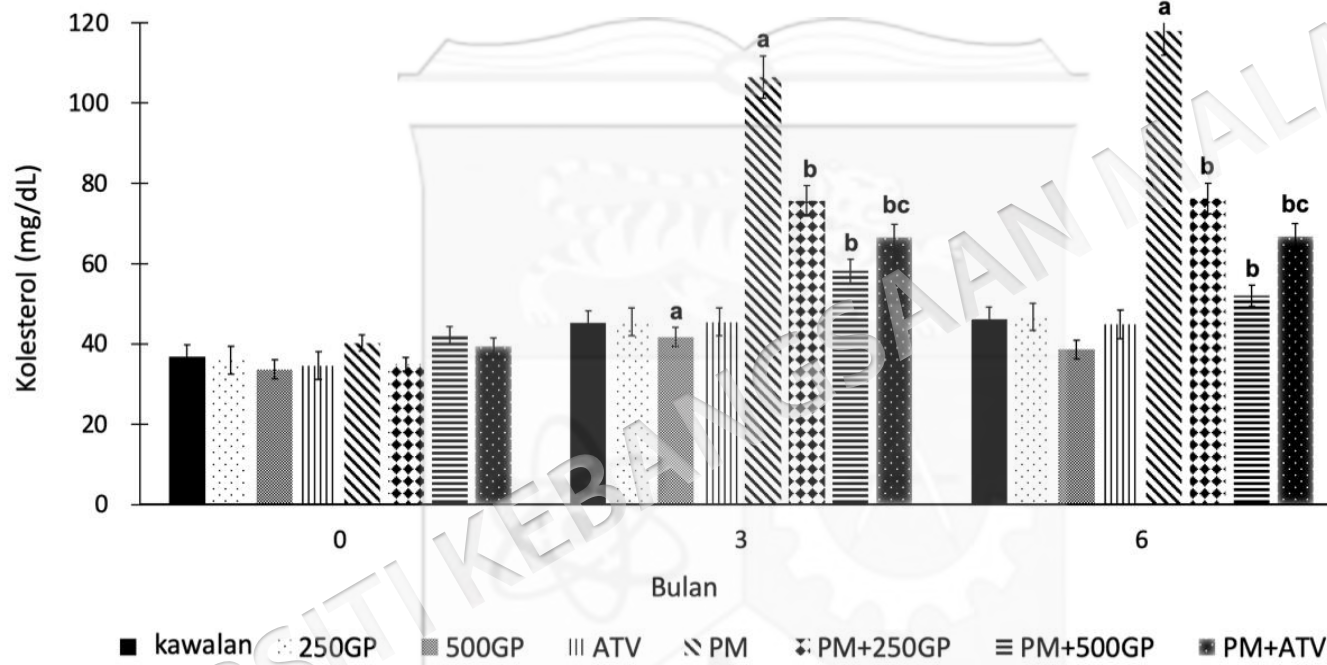


Rajah 4.7 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras triasilgliserol jumlah tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). a perbezaan signifikan berbanding kawalan, b perbezaan signifikan berbanding PM dan c perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.7.2 Aras Kolesterol Jumlah Serum

Aras kolesterol jumlah (TC) dalam serum kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.8). Walau bagaimanapun, aras jumlah TC kumpulan sham (500GP) yang diberi suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 500 mg/kg menunjukkan penurunan signifikan berbanding kumpulan kawalan pada bulan ke-3 dan ke-6.

Aras kolesterol jumlah kumpulan PM meningkat dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras jumlah TC kumpulan PM+250GP dan PM+500GP dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras jumlah TC yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM dan PM+250GP pada bulan ke-3 dan ke-6.

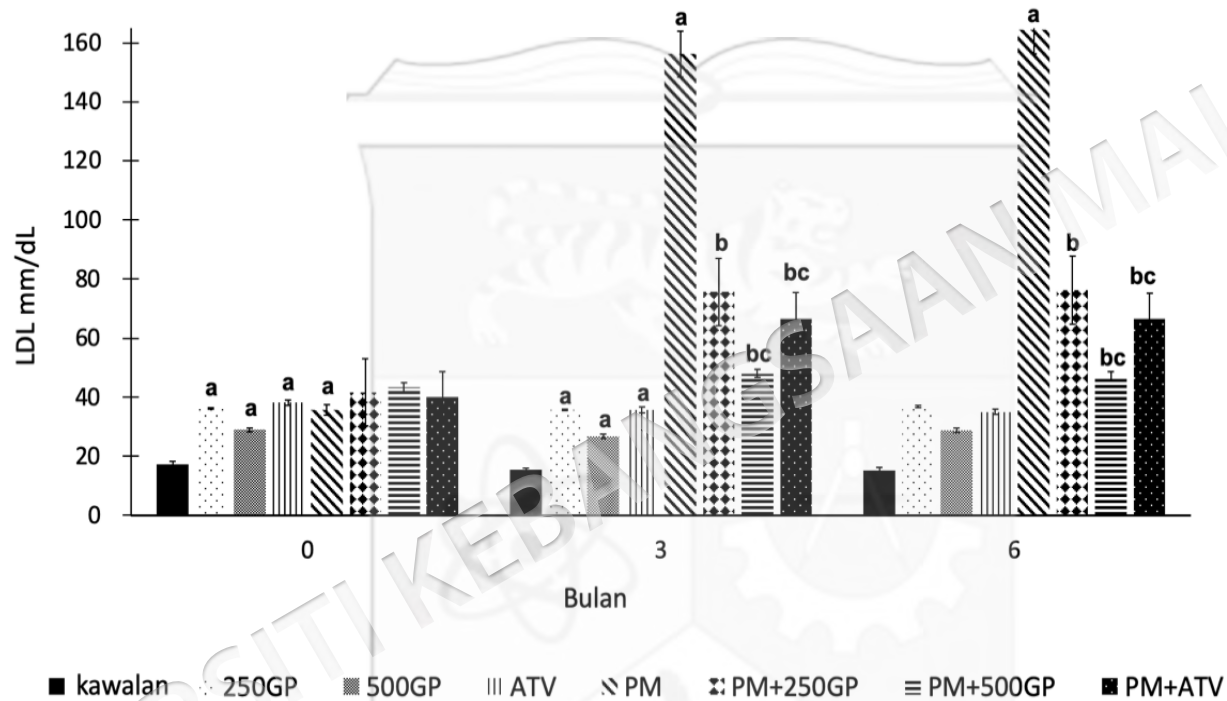


Rajah 4.8 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras kolesterol jumlah tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai ( $n=6$ ). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ )

### 4.7.3 Aras Lipoprotein Berketumpatan Rendah Serum

Aras lipoprotein berketumpatan rendah (LDL) dalam serum kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.9). Walau bagaimanapun, aras LDL kumpulan sham (250GP, 500GP dan ATV) menunjukkan penurunan signifikan berbanding kumpulan kawalan pada bulan ke-3.

Aras lipoprotein berketumpatan rendah kumpulan PM meningkat dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras LDL kumpulan PM+250GP dan PM+500GP dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras LDL yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM dan PM+250GP pada bulan ke-3 dan ke-6.

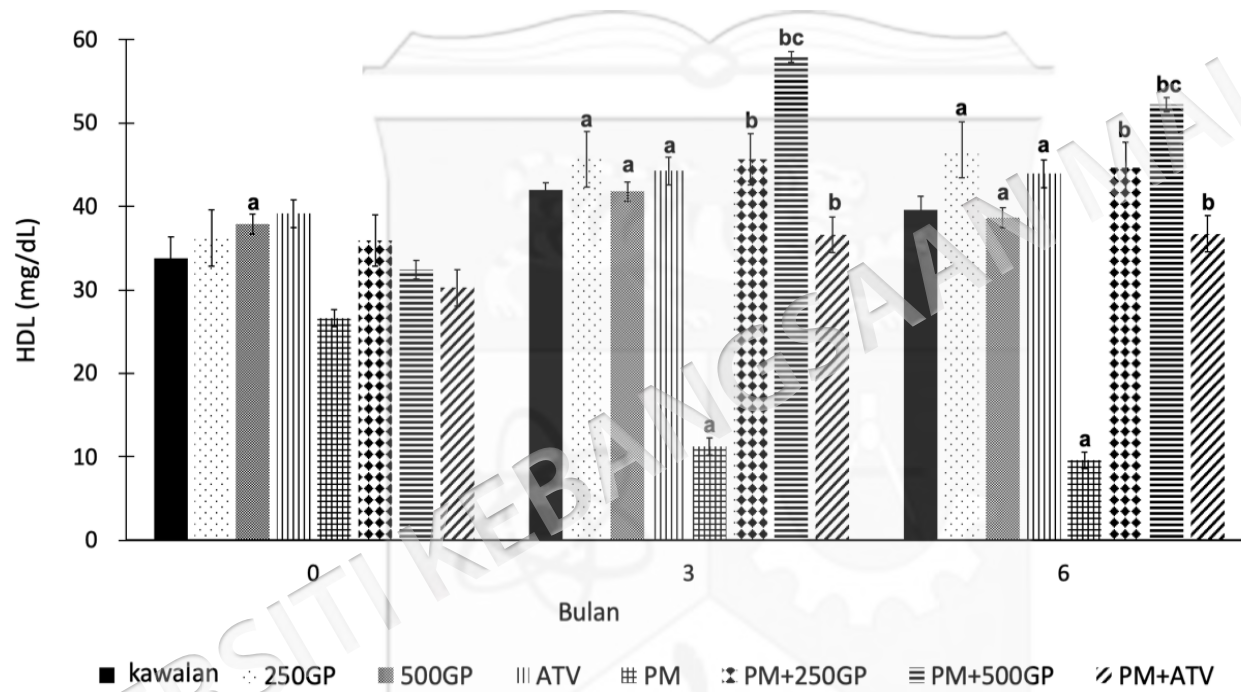


Rajah 4.9 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras lipoprotein berketumpatan rendah tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). a perbezaan signifikan berbanding kawalan, b perbezaan signifikan berbanding PM dan c perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.7.4 Aras Lipoprotein Berketumpatan Tinggi Serum

Aras lipoprotein berketumpatan tinggi (HDL) dalam serum kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.10). Walau bagaimanapun, aras HDL kumpulan sham (250GP, 500GP dan ATV) menunjukkan peningkatan signifikan berbanding kumpulan kawalan pada bulan ke-3 dan ke-6.

Aras lipoprotein berketumpatan tinggi kumpulan PM menurun dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg meningkatkan aras HDL kumpulan PM+250GP dan PM+500GP dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras LDL yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6.

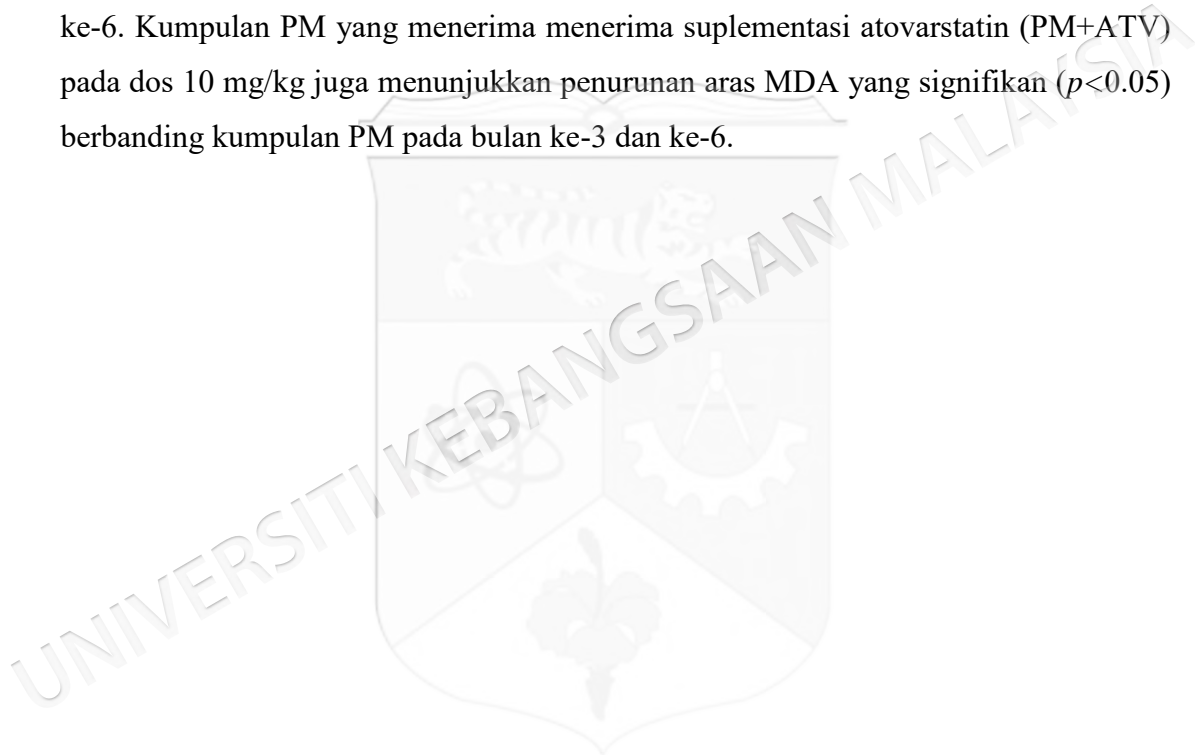


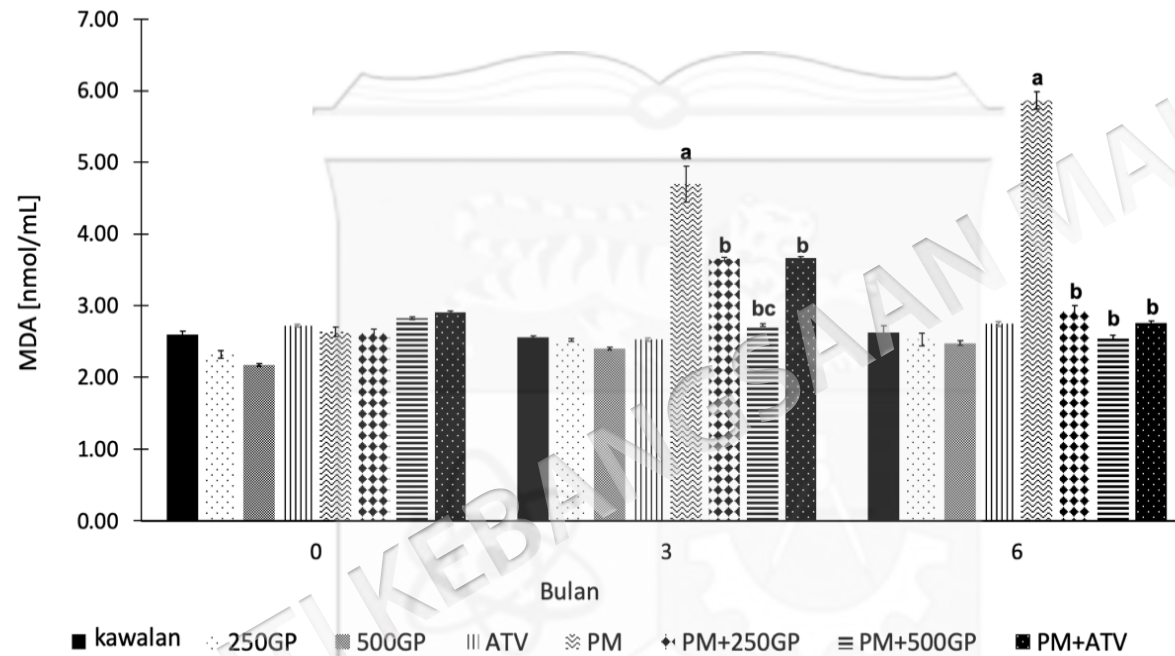
Rajah 4.10 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras lipoprotein berketumpatan tinggi tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata ± sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.8 ARAS MALONDIALDEHID PLASMA TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

Aras malondialdehid (MDA) dalam plasma kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.11).

Aras malondialdehid kumpulan PM meningkat dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras MDA kumpulan PM+250GP dan PM+500GP dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras MDA yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6.





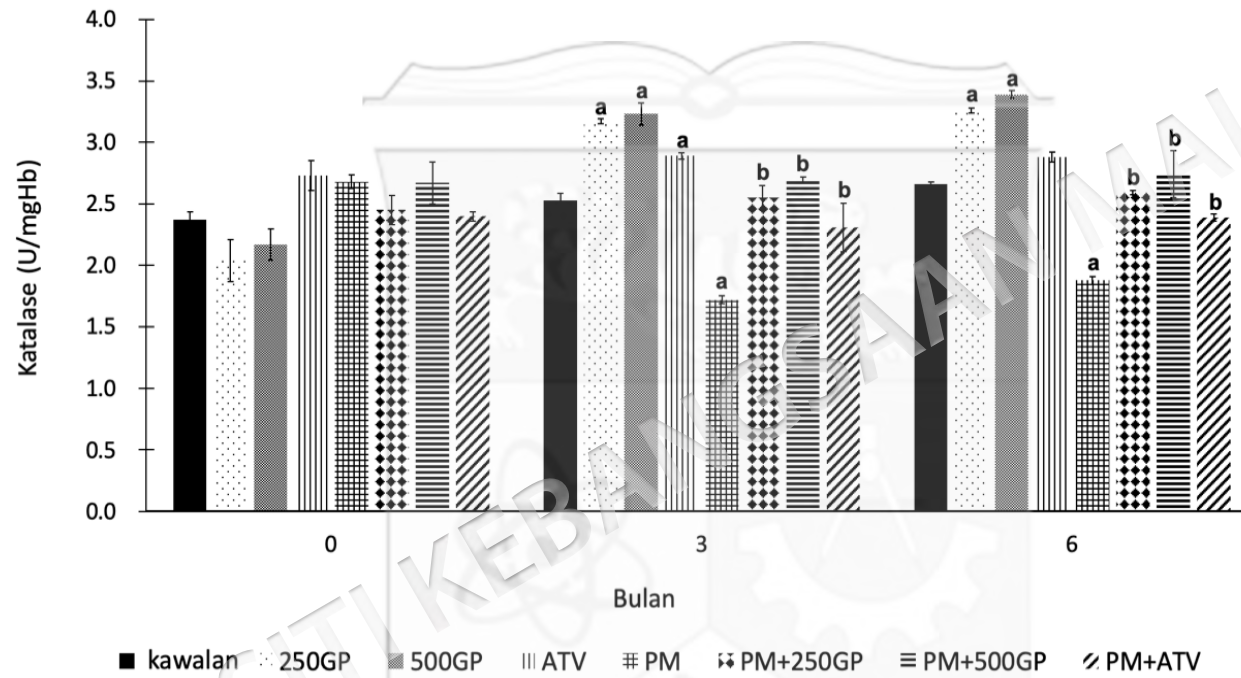
Rajah 4.11 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap kepekatan malondialdehid tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). a perbezaan signifikan berbanding kawalan, b perbezaan signifikan berbanding PM dan c perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

## 4.9 AKTIVITI ENZIM ANTIOKSIDAN ERITROSIT TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

### 4.9.1 Enzim Katalase

Aktiviti enzim katalase (CAT) dalam eritrosit kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.12). Walau bagaimanapun, aktiviti CAT kumpulan sham (250GP dan 500GP) menunjukkan peningkatan signifikan berbanding kumpulan kawalan pada bulan ke-3 dan ke-6.

Aktiviti enzim katalase kumpulan PM menurun dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg meningkatkan aktiviti CAT kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan peningkatan aktiviti CAT yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6.

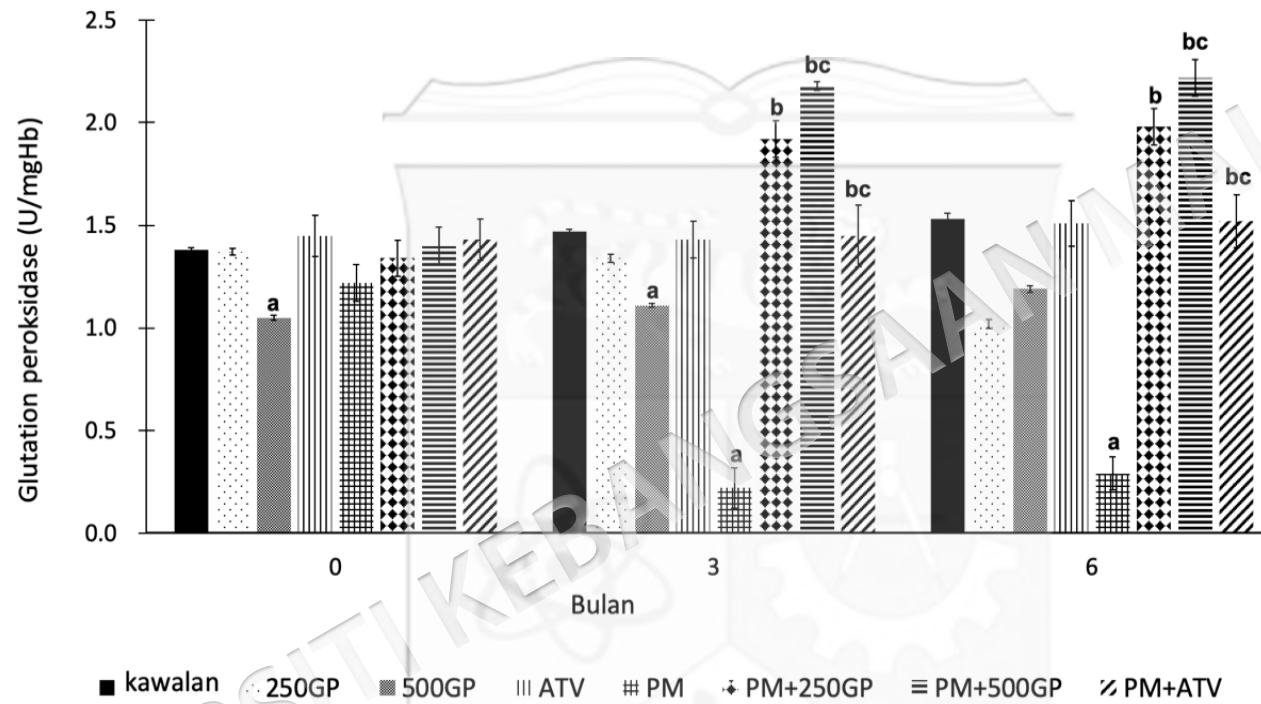


Rajah 4.12 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol terhadap aktiviti enzim katalase tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). a perbezaan signifikan berbanding kawalan, b perbezaan signifikan berbanding PM dan c perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.9.2 Enzim Glutation Peroksidase

Aktiviti enzim glutathione peroxidase (GPx) dalam eritrosit kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.13). Walau bagaimanapun, aktiviti GPx kumpulan sham (500GP) menunjukkan penurunan signifikan berbanding kumpulan kawalan pada bulan ke-3.

Aktiviti enzim glutathione peroxidase kumpulan PM menurun dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg meningkatkan aktiviti GPx kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima menerima suplementasi atovastatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan peningkatan aktiviti GPx yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM dan PM+250GP pada bulan ke-3 dan ke-6.



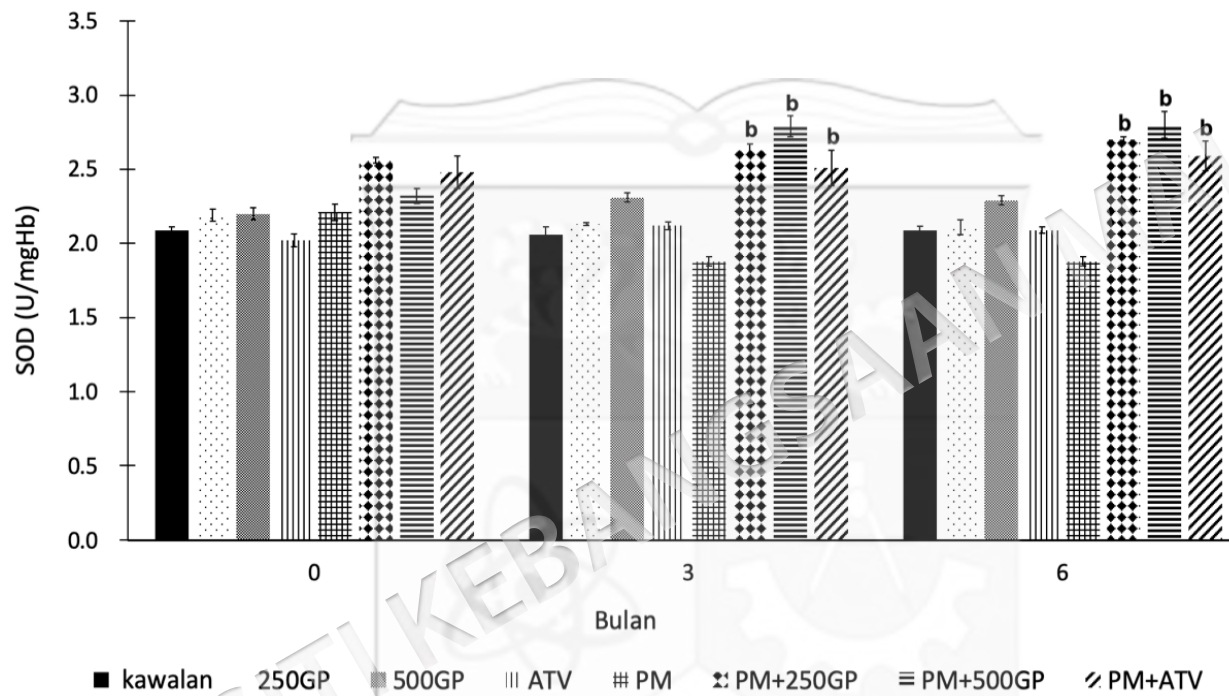
Rajah 4.13 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aktiviti enzim glutathione peroksidase tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

### 4.9.3 Enzim Superoksida Dismutase

Aktiviti enzim superoksida dismutase (SOD) dalam eritrosit kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.14).

Aktiviti enzim superoksida dismutase kumpulan PM menurun pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg meningkatkan aktiviti SOD kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan peningkatan aktiviti SOD yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6.





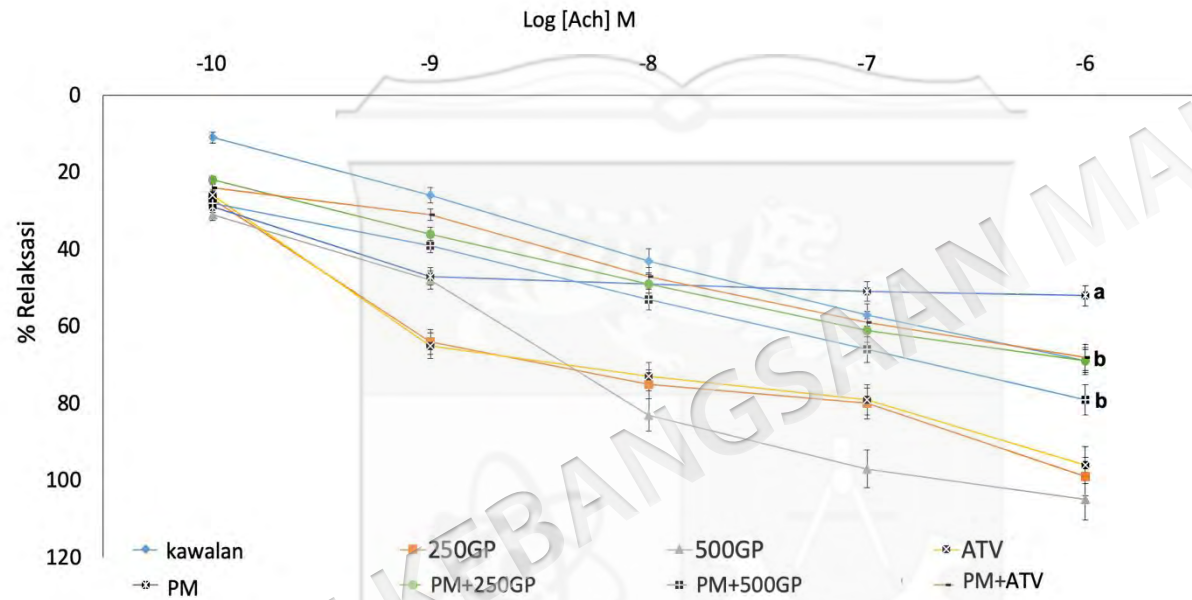
Rajah 4.14 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aktiviti enzim superoksida dismutase tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.10 KEREAKTIFAN VASKULAR AORTA TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

##### 4.10.1 Kereaktifan Vaskular Aorta Aruhan Asetikolin

Asetilkolin (Ach) mengaruh relaksasi (vasodilatasi) vaskular cecincin aorta tikus bermula dari  $10^{-10}$  M hingga  $10^{-6}$  M. Peratus vasodilatasi vaskular cecincin aorta tikus meningkat mengikut peningkatan kepekatan Ach (Rajah 4.15). Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg (kumpulan 250GP) dan 500 mg/kg (kumpulan 500GP) serta pemberian 10 mg/kg atorvastatin (kumpulan ATV) meningkatkan peratus vasodilatasi vaskular cecincin aorta tikus berbanding kumpulan kawalan.

Peratus vasodilasi vaskular kumpulan PM menurun ( $47.3\% \pm 1.03$ ) berbanding kumpulan kawalan ( $72.5\% \pm 1.35$ ) dengan aruhan Ach berkepekatan  $10^{-6}$  M. Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg pada kumpulan PM meningkatkan peratus vasodilatasi vaskular masing-masing ke peratus  $74.1\% \pm 1.31$  dan  $78.4\% \pm 0.93$  berbanding kumpulan PM dengan aruhan Ach berkepekatan  $10^{-6}$  M. Namun, pemberian 10 mg/kg atorvastatin ke atas PM tidak menunjukkan perbezaan peratus vasodilatasi vaskular berbanding kumpulan PM.

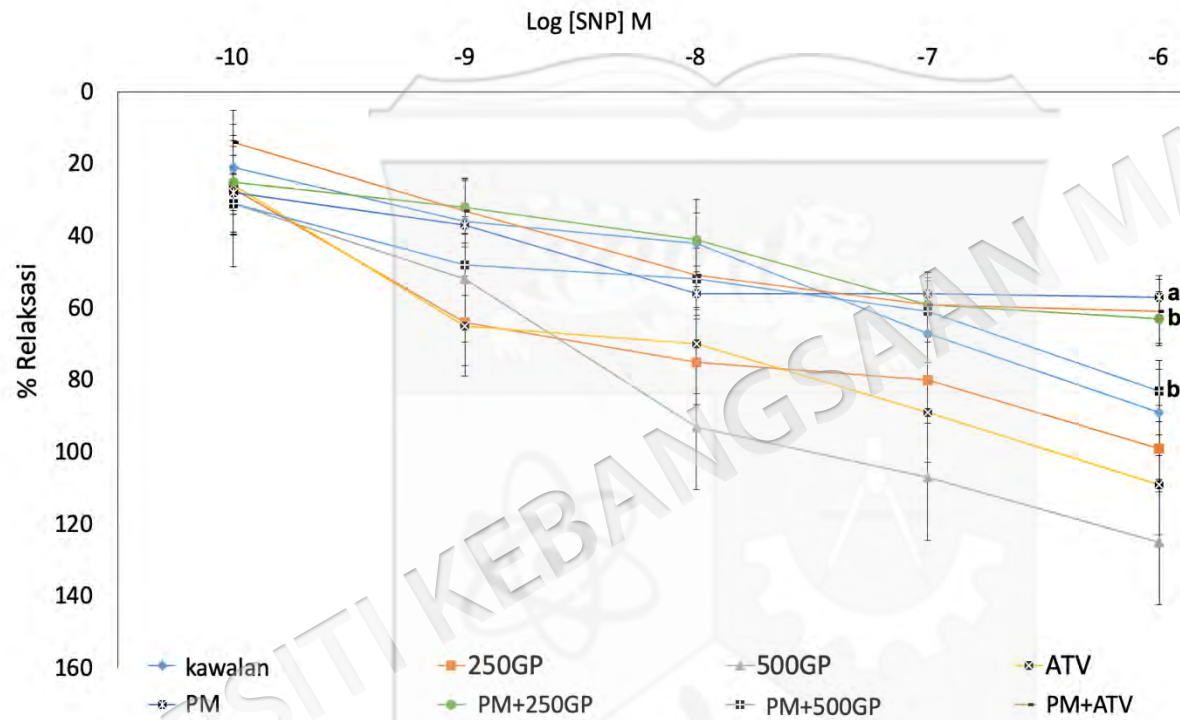


Rajah 4.15 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap kereaktifan vaskular (relaksasi) aorta aruhan asetilkolin tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan dan <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM ( $p < 0.05$ )

#### 4.10.2 Kereaktifan Vaskular Aorta Aruhan Natrium Nitroprusida

Natrium nitroprusida (SNP) mengaruh relaksasi (vasodilatasi) vaskular cecincin aorta tikus bermula dari  $10^{-10}$  M hingga  $10^{-6}$  M. Peratus vasodilatasi vaskular cecincin aorta tikus meningkat mengikut peningkatan kepekatan Ach (Rajah 4.16). Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg (kumpulan 250GP) dan 500 mg/kg (kumpulan 500GP) serta pemberian 10 mg/kg atorvastatin (kumpulan ATV) meningkatkan peratus vasodilatasi vaskular cecincin aorta tikus berbanding kumpulan kawalan.

Peratus vasodilasi vaskular kumpulan PM menurun ( $53.7\% \pm 1.21$ ) berbanding kumpulan kawalan ( $77.9\% \pm 1.03$ ) dengan aruhan SNP berkepekatan  $10^{-6}$  M. Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg pada kumpulan PM meningkatkan peratus vasodilatasi vaskular masing-masing ke peratus  $83.1\% \pm 1.23$  dan  $84.2\% \pm 1.22$  berbanding kumpulan PM dengan aruhan SNP berkepekatan  $10^{-6}$  M. Namun, pemberian 10 mg/kg atorvastatin ke atas PM tidak menunjukkan perbezaan peratus vasodilatasi vaskular berbanding kumpulan PM.

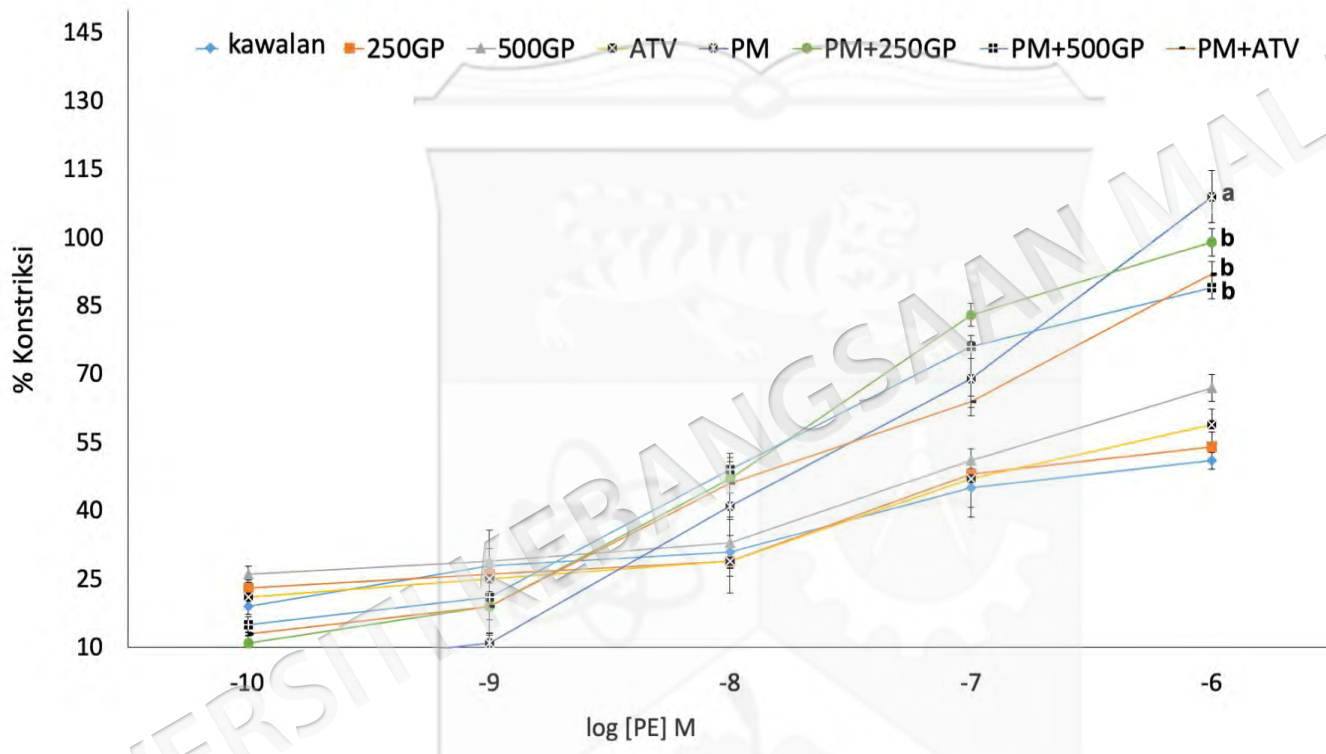


Rajah 4.16 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap kereaktifan vaskular (relaksasi) aorta aruhan natrium nitroprusida tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan dan <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM ( $p < 0.05$ )

#### 4.10.3 Kereaktifan Vaskular Aorta Aruhan Natrium Fenilefrin

Fenilefrin (PE) mengaruh vasokonstriksi cecincin aorta tikus bermula dari  $10^{-10}$  M hingga  $10^{-6}$  M. Peratus vasokonstriksi cecincin aorta tikus meningkat mengikut peningkatan kepekatan PE (Rajah 4.17). Supplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg (kumpulan 250GP) dan 500 mg/kg (kumpulan 500GP) serta pemberian 10 mg/kg atorvastatin (kumpulan ATV) meningkatkan peratus vasokonstriksi vaskular cecincin aorta tikus berbanding kumpulan kawalan.

Peratus konstriksi vaskular kumpulan PM meningkat ( $111.3\% \pm 0.91$ ) berbanding kumpulan kawalan ( $51.8\% \pm 0.89$ ). Supplementasi ekstrak *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg pada kumpulan PM menurunkan peratus vasokonstriksi vaskular masing-masing ke peratus  $102.5\% \pm 1.01$  dan  $88.3\% \pm 1.06$  berbanding kumpulan PM aruhan PE berkepekatan  $10^{-6}$  M. Namun, pemberian 10 mg/kg atorvastatin ke atas PM tidak menunjukkan perbezaan peratus vasokonstriksi vaskular.

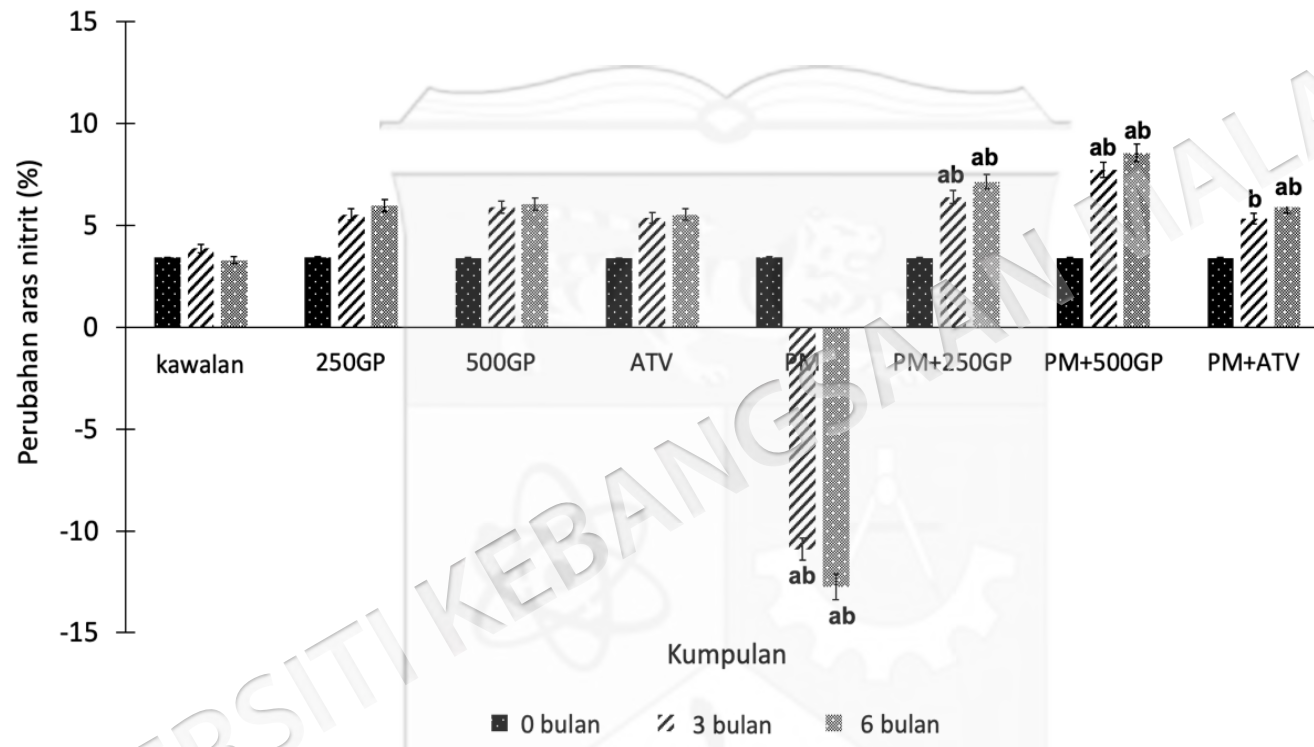


Rajah 4.17 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap kereaktifan vaskular (konstriksi) aorta aruhan fenilefrin tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata ± sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan dan <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM ( $p < 0.05$ )

#### 4.11 ARAS NITRIK OKSIDA PLASMA TIKUS MENOPAUS

Nitrit adalah produk metabolisme nitrik oksida (NO). Aras nitrit (NO) dalam plasma pada bulan 0, ke-3 dan ke-6 ditunjukkan pada Rajah 4.18. Di awal kajian didapati aras nitrit dalam plasma tikus tidak menunjukkan perbezaan antara kumpulan kajian. Selepas 24 minggu kajian didapati aras nitrit dalam plasma kumpulan PM menurun dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg, 500 mg/kg dan atorvastatin pada dos 10 mg/kg pada bulan ke-3 dan ke-6 kajian meningkatkan aras nitrit kumpulan tikus PM berbanding kumpulan PM tanpa rawatan.



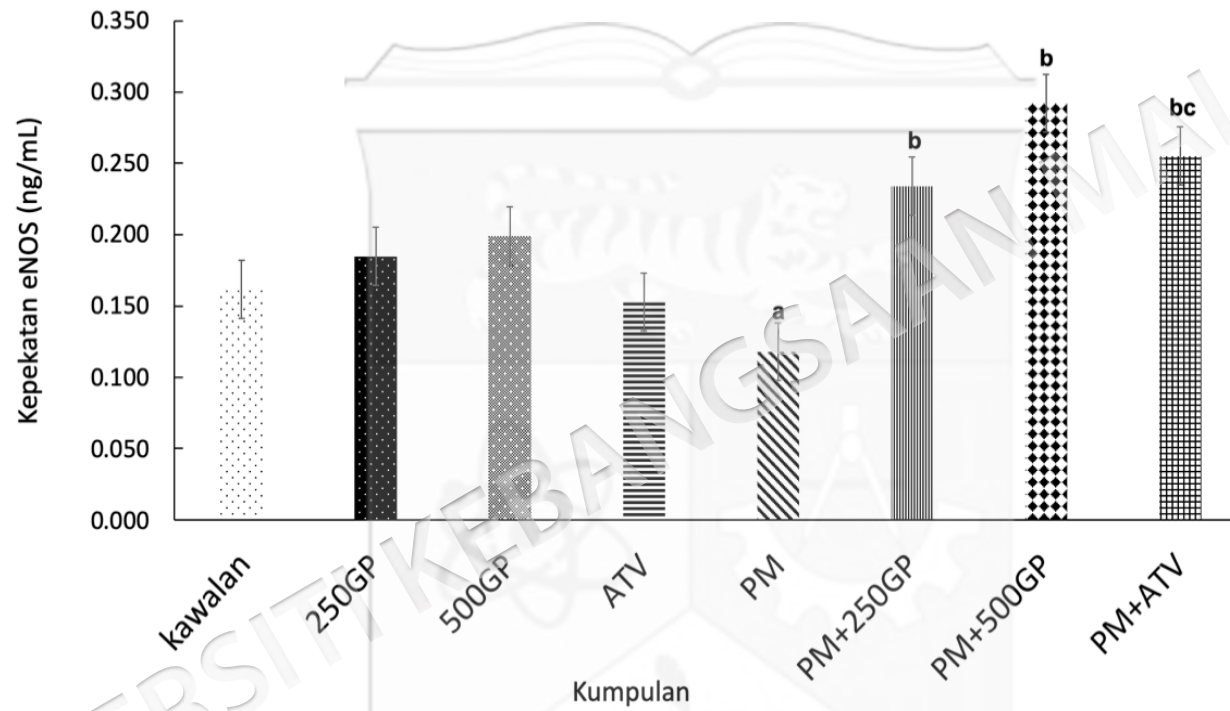


Rajah 4.18 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap perubahan peratusan aras nitrit plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan dan <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM ( $p < 0.05$ )

#### 4.12 ARAS KEPEKATAN NITRIK OKSIDA SINTASE JENIS ENDOTELIUM PLASMA TIKUS MENOPAUS

Aras kepekatan nitrik oksida sintase jenis endotelium (eNOS) dalam plasma ditunjukkan pada Rajah 4.19. Aras kepekatan eNOS dalam plasma kumpulan PM menurun dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) sebanyak  $0.13 \text{ ng/mL} \pm 1.01$  berbanding  $0.17 \text{ ng/mL} \pm 1.24$  pada kumpulan kawalan. Supplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos  $250 \text{ mg/kg}$  dan  $500 \text{ mg/kg}$  meningkatkan aras kepekatan eNOS dalam plasma dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding tikus kumpulan PM. Supplementasi dengan atovarstatin ( $10 \text{ mg/kg}$ ) juga meningkatkan aras kepekatan eNOS dalam plasma dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding tikus kumpulan PM+250GP.



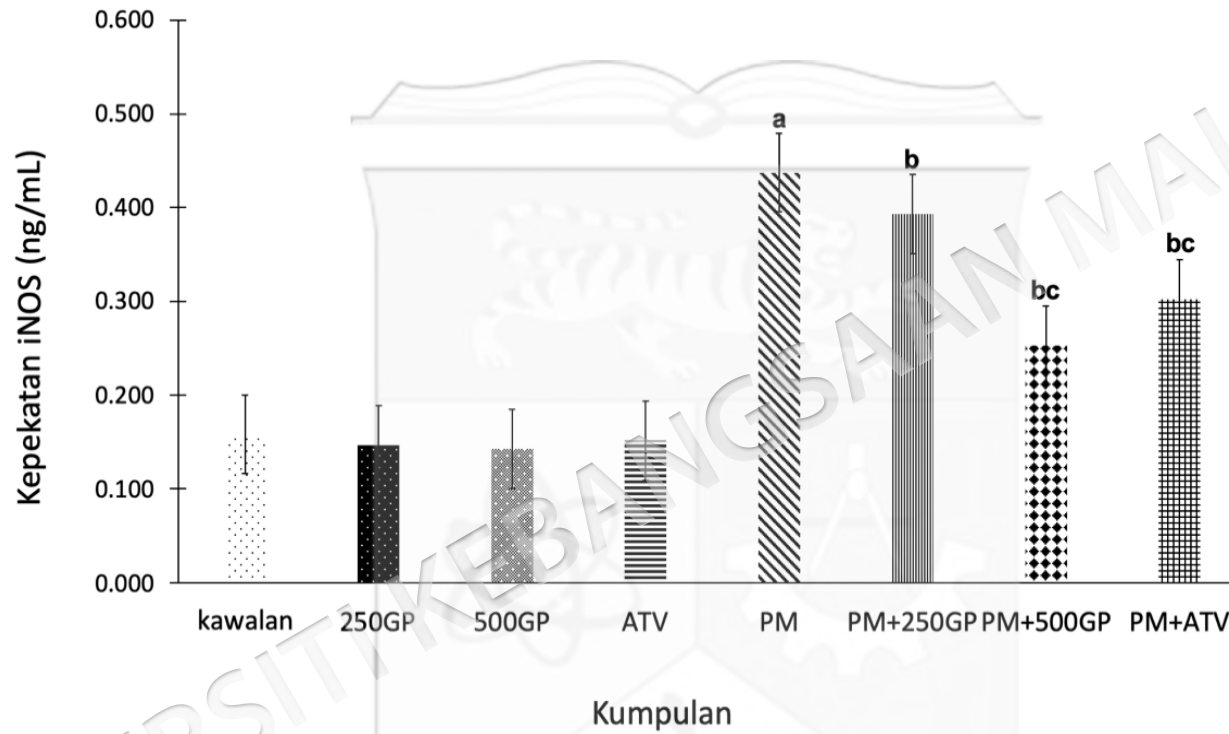


Rajah 4.19 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras kepekatan nitrik oksida sintase jenis endotelium plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.13 ARAS KEPEKATAN NITRIK OKSIDA SINTASE JENIS INDUKSI PLASMA TIKUS MENOPAUS

Aras kepekatan nitrik oksida sintase jenis induksi plasma ditunjukkan pada Rajah 4.20. Aras kepekatan iNOS dalam plasma kumpulan PM meningkat dengan signifikan sebanyak  $0.42 \text{ ng/mL} \pm 1.14$  berbanding  $0.17 \text{ ng/mL} \pm 1.23$  pada kumpulan kawalan. Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras kepekatan iNOS dalam plasma dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding tikus kumpulan PM. Suplementasi dengan atovarstatin (10 mg/kg) juga menurunkan aras kepekatan iNOS dalam plasma dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding tikus kumpulan PM+250GP.





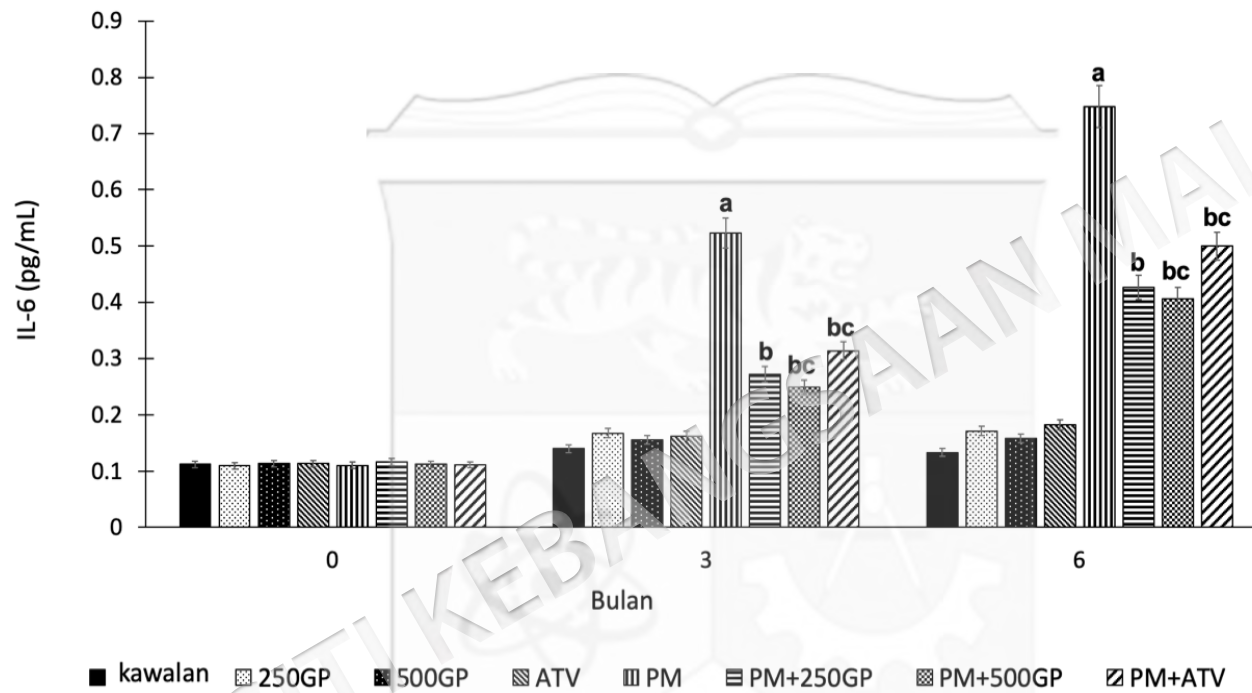
Rajah 4.20 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras kepekatan nitrik oksida sintase jenis induksi plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.14 ARAS PENANDA INFLAMASI PLASMA TIKUS MENAPPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

##### 4.14.1 Aras Interlukin-6

Aras interlukin-6 (IL-6) dalam plasma kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.21). Aras interlukin-6 kumpulan PM meningkat pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras IL-6 kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras IL-6 yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM dan PM+250GP pada bulan ke-3 dan ke-6.

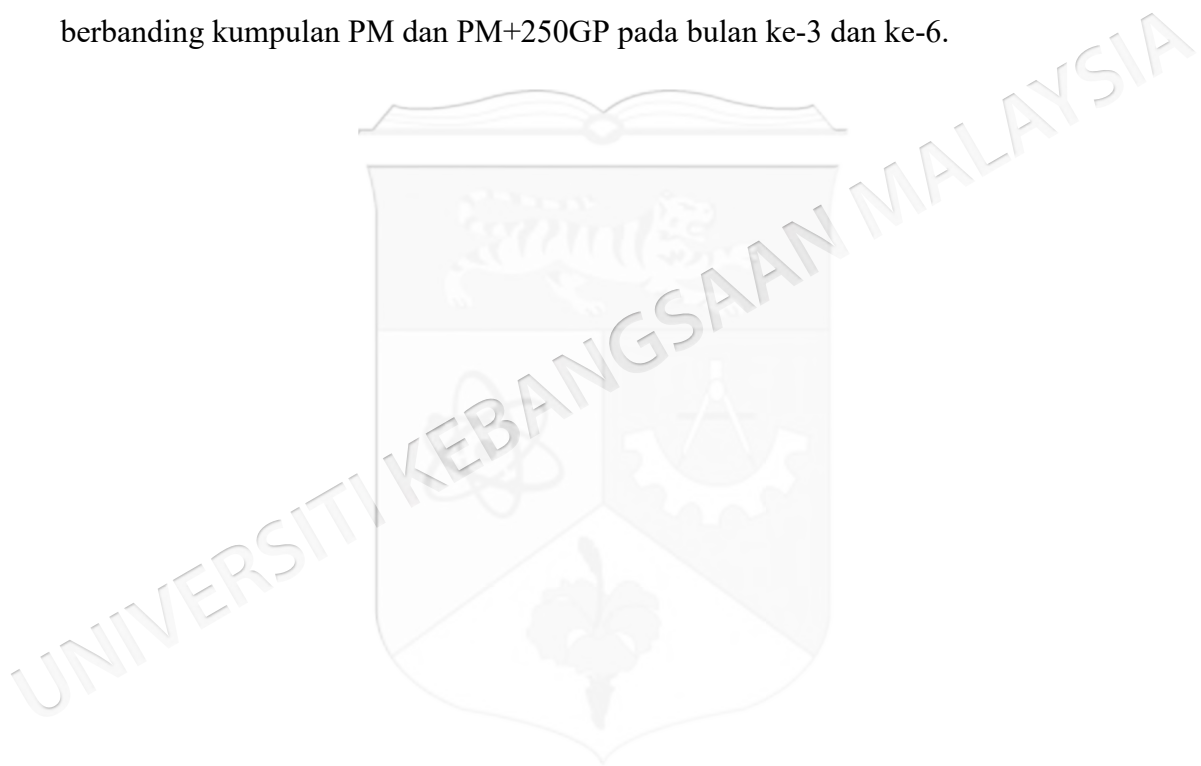


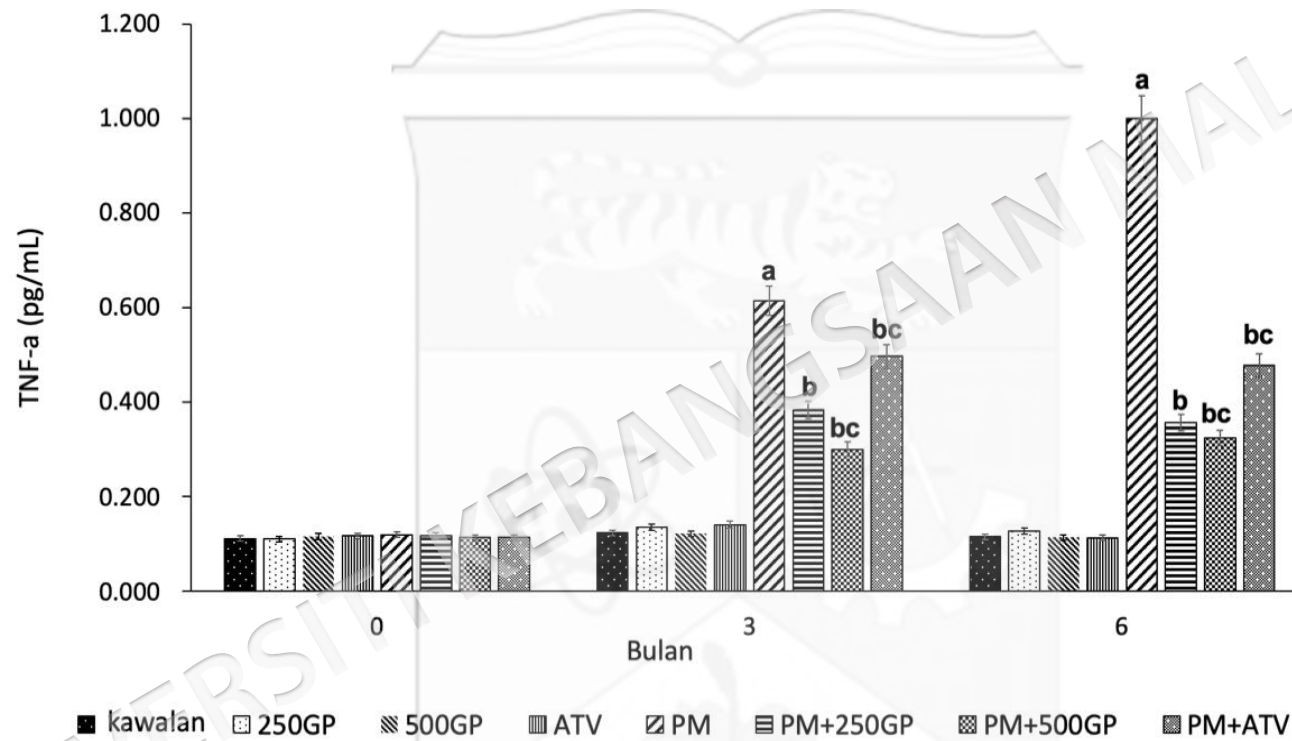


Rajah 4.21 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras interleukin-6 plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.14.2 Aras Faktor Nekrosis Tumor -Alfa

Aras faktor nekrosis tumor-alfa (TNF- $\alpha$ ) dalam plasma kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.22). Aras nekrosis tumor-alfa kumpulan PM meningkat pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras TNF- $\alpha$  kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras TNF- $\alpha$  yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM dan PM+250GP pada bulan ke-3 dan ke-6.



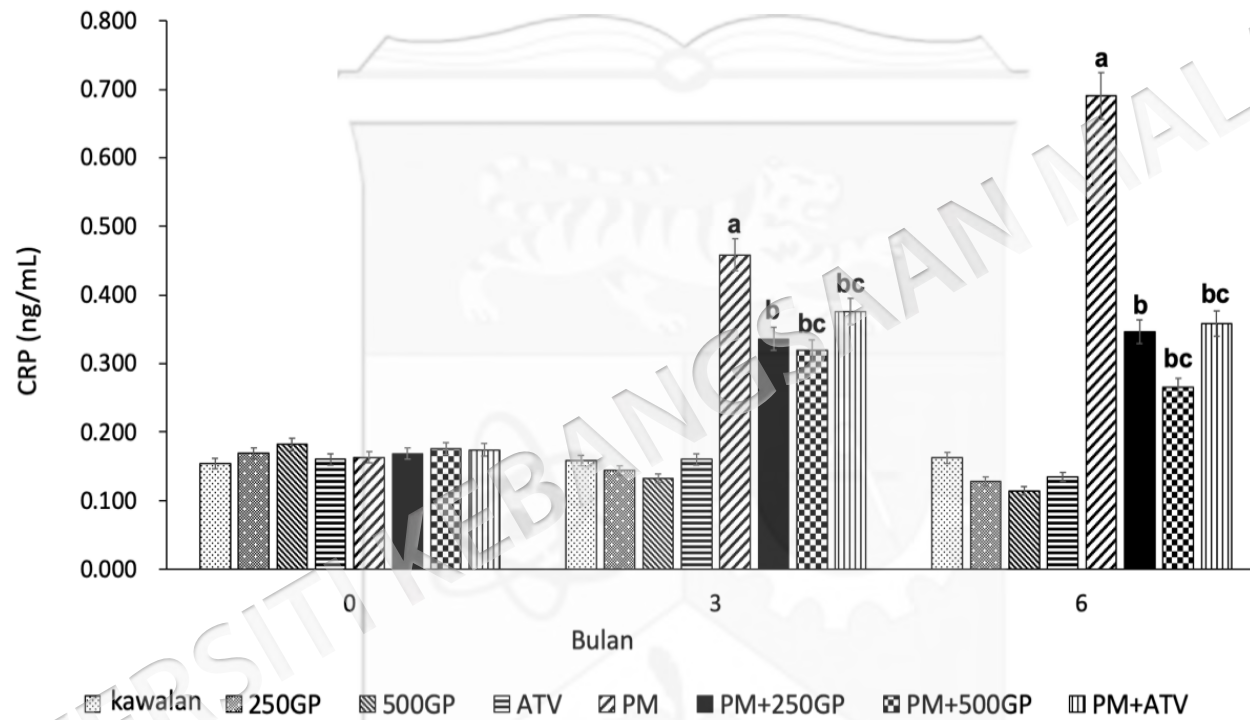


Rajah 4.22 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras faktor nekrosis tumor-alfa plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai ( $n=6$ ). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p<0.05$ )

#### 4.14.3 Aras Protein Reaktif C

Aras protein reaktif C (CRP) dalam plasma kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding di permulaan kajian (Rajah 4.23). Aras protein reaktif C kumpulan PM meningkat pada bulan ke-3 dan ke-6 berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras CRP kumpulan PM pada bulan ke-3 dan ke-6. Kumpulan PM yang menerima menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras TNF- $\alpha$  yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM dan PM+250GP pada bulan ke-3 dan ke-6.





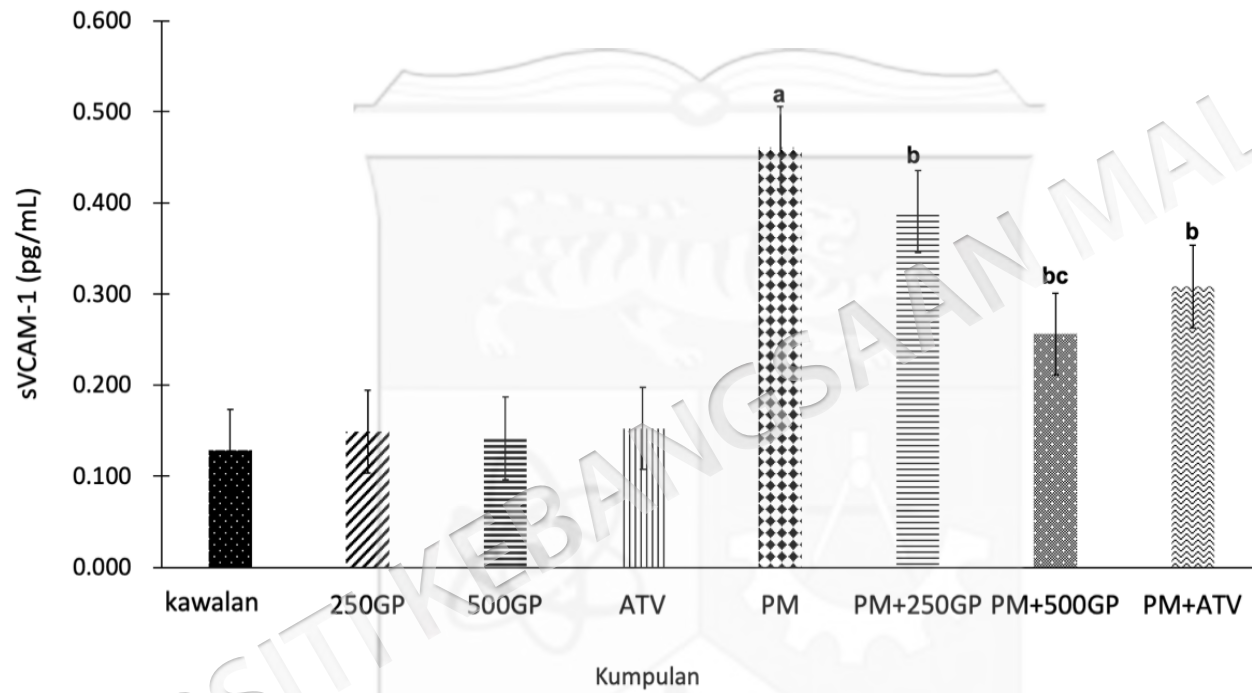
Rajah 4.23 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras protein reaktif c plasma tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.15 ISYARAT VASKULAR ENDOTELIUM AORTA TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

##### 4.15.1 Aras Molekul Lekatan Vaskular Terlarut-1

Aras molekul lekatan vaskular terlarut-1 (sVCAM-1) dalam tisu aorta kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan berbanding kawalan (Rajah 4.24). Aras molekul lekatan vaskular terlarut-1 kumpulan PM meningkat berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras sVCAM-1. Kumpulan PM yang menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras sVCAM-1 yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM.



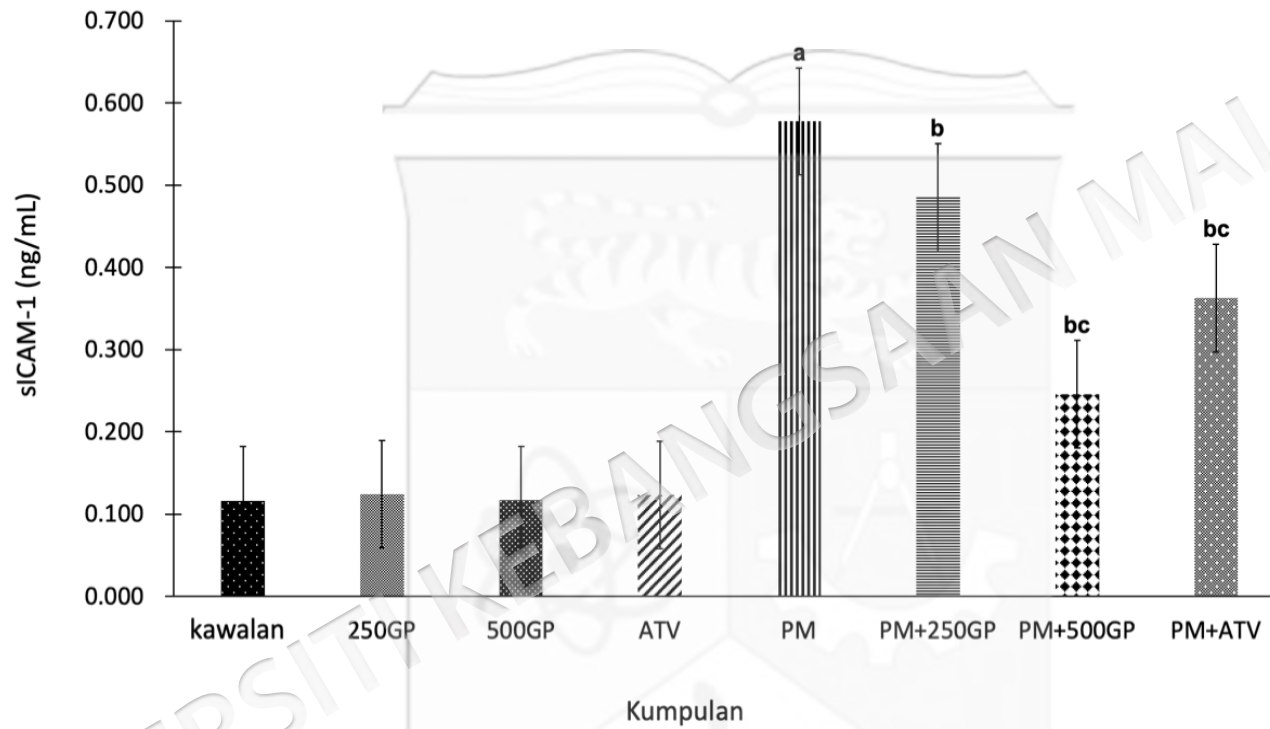


Rajah 4.24 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras molekul lekatan vaskular terlarut-1 tisu aorta tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). a perbezaan signifikan berbanding kawalan, b perbezaan signifikan berbanding PM dan c perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

#### 4.15.2 Aras Molekul Lekatan Intersel Terlarut-1

Aras molekul lekatan intersel terlarut-1 (sICAM-1) dalam tisu aorta kumpulan sham tidak menunjukkan perubahan berbanding kawalan (Rajah 4.25). Aras molekul lekatan intersel terlarut-1 kumpulan PM meningkat berbanding kumpulan kawalan. Suplementasi *Gynura procumbens* dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menurunkan aras sICAM-1. Kumpulan PM yang menerima suplementasi atovarstatin (PM+ATV) pada dos 10 mg/kg juga menunjukkan penurunan aras sICAM-1 yang signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan PM.





Rajah 4.25 Kesan suplemen ekstrak 80% etanol *Gynura procumbens* terhadap aras molekul lekatan intersej terlarut-1 tisu aorta tikus kumpulan sham dan pascamenopaus. Nilai dinyatakan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai (n=6). <sup>a</sup> perbezaan signifikan berbanding kawalan, <sup>b</sup> perbezaan signifikan berbanding PM dan <sup>c</sup> perbezaan signifikan berbanding PM+250GP ( $p < 0.05$ )

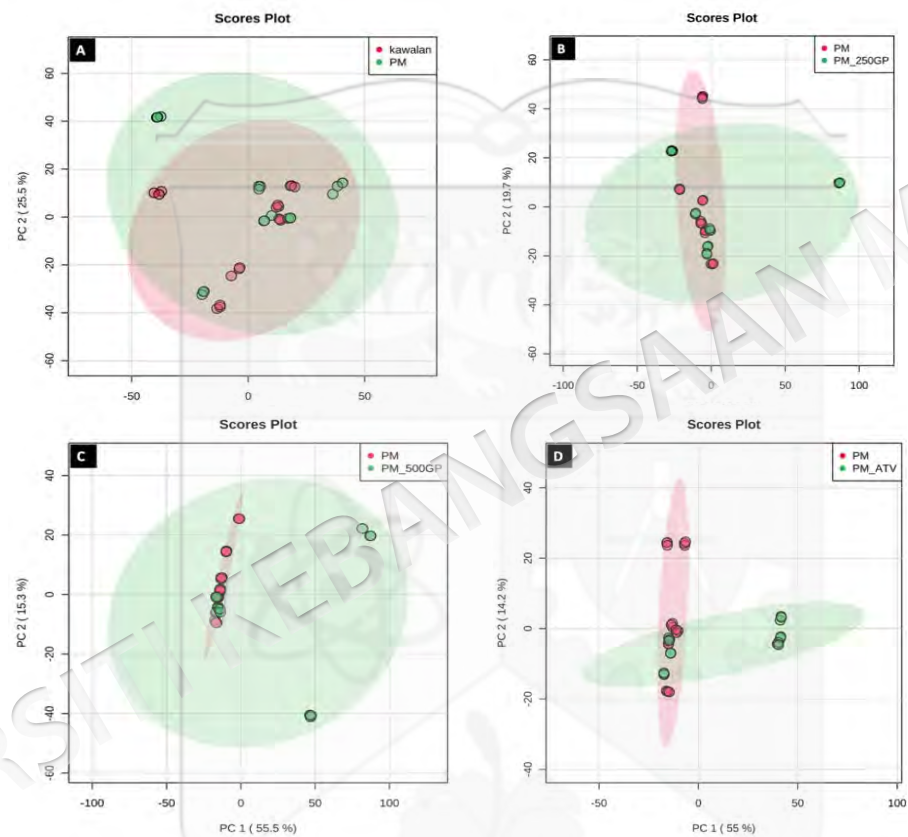
#### 4.16 PROFIL METABOLOMIK TIKUS MENOPAUS DIBERI DIET TINGGI LEMAK

##### 4.16.1 Perubahan Profil Metabolit Global Aorta

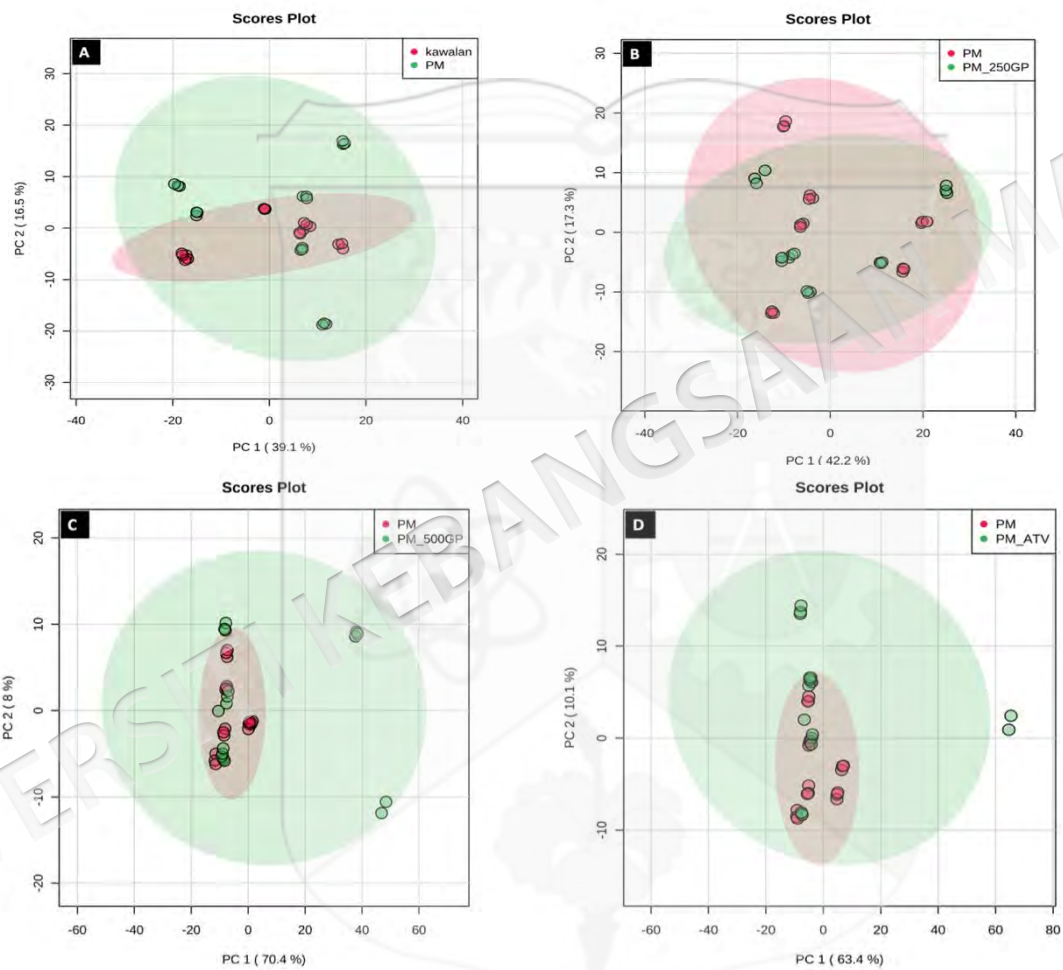
Peta skala penuh plot skor *Principal Component Analysis* (PCA) tanpa penyeliaan merupakan teknik statistik multivariat yang memaparkan data dalam bentuk dua dimensi. Graf PCA yang dijana oleh perisian MetaboAnalyst versi 4.0 digunakan sebagai penilaian awal untuk menentukan kualiti sampel melalui pemisahan di antara sampel replikat. Setiap plot skor dalam graf PCA mewakili satu sampel terdiri dari tiga replikat yang diberi warna merah dan hijau.

Rajah 4.26 menunjukkan graf PCA bagi kumpulan PM vs kawalan, PM+250GP vs PM, PM+500GP vs PM dan PM+ATV vs PM dalam mod positif dan Rajah 4.27 menunjukkan graf PCA bagi kumpulan PM vs kawalan, PM+250GP vs PM, PM+500GP vs PM dan PM+ATV vs PM dalam mod negatif. Hampir kesemua plot skor dalam setiap kumpulan mempunyai pertindihan yang banyak dalam kedua-dua mod tetapi tiada pemisahan yang jelas ditunjukkan pada setiap kumpulan melalui analisis PCA.

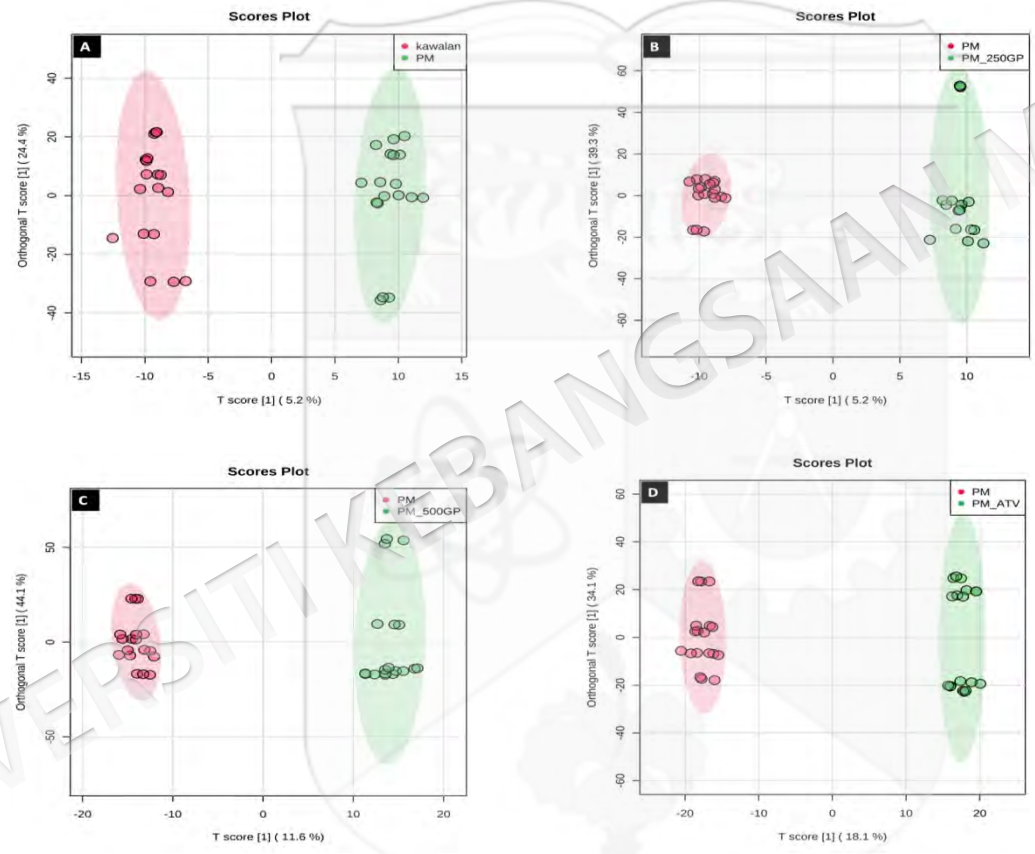
Analisis multivariat *Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis* (OPLS-DA) pula digunakan untuk melihat pemisahan yang lebih jelas antara kumpulan dan mengenal pasti metabolit yang menyumbang kepada perbezaan antara kumpulan. Plot skor dalam graf OPLS-DA dalam Rajah 4.28 menunjukkan pemisahan bagi sampel-sampel kumpulan PM vs kawalan, PM+250GP vs PM, PM+500GP vs PM dan PM+ATV vs PM bagi mod positif manakala mod negatif ditunjukkan dalam Rajah 4.29 bagi sampel-sampel kumpulan PM vs kawalan, PM+250GP vs PM, PM+500GP vs PM dan PM+ATV vs PM.



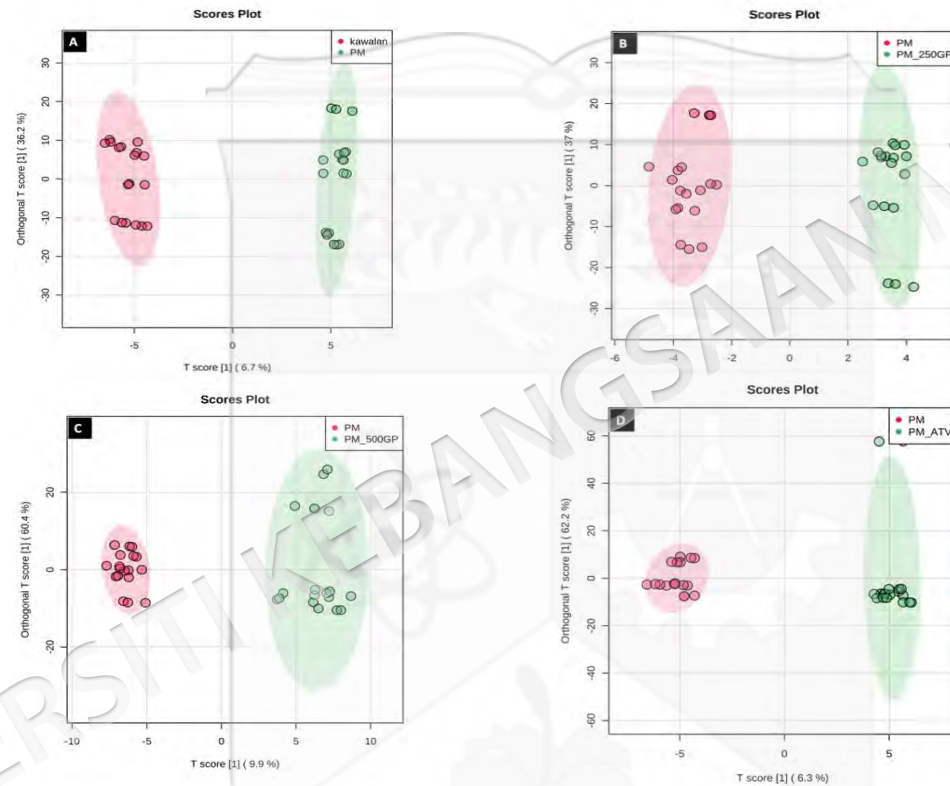
Rajah 4.26 Plot skor Principal Component Analysis (PCA) mod positif bagi kumpulan (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM. Setiap titik mewakili satu sampel. Setiap titik bulat mewakili satu metabolit



Rajah 4.27 Plot skor Principal Component Analysis (PCA) mod negatif bagi kumpulan (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM. Setiap titik mewakili satu sampel. Setiap titik bulat mewakili satu metabolit



Rajah 4.28 Plot skor Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) mod positif bagi kumpulan (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM. Setiap titik mewakili satu sampel. Setiap titik bulat mewakili satu metabolit



Rajah 4.29 Plot skor Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) mod negatif bagi kumpulan (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM. Setiap titik mewakili satu sampel. Setiap titik bulat mewakili satu metabolit

Apabila analisis multivariat OPLS-DA dijalankan, perbandingan untuk semua kumpulan menunjukkan perubahan metabolit adalah signifikan. Sebanyak Kemudian, perbandingan dilihat menggunakan ujian permutasi melalui semakan silang untuk mendapat nilai R<sup>2</sup> dan Q<sup>2</sup><sub>Y</sub>. Nilai R<sup>2</sup> dan Q<sup>2</sup><sub>Y</sub> yang tinggi adalah indikasi kepada keteguhan dan kekuatan model ramalan OPLS-DA ditunjukkan dalam Jadual 4.5. Nilai terhimpun bagi R<sup>2</sup> dan Q<sup>2</sup><sub>Y</sub> yang melebihi 0.7 adalah indikasi kepada model yang baik.

Jadual 4.5 Ujian permutasi bagi analisis multivariat menggunakan OPLS-DA

Perbandingan antara kumpulan	ESI	R <sup>2</sup> <sub>Y</sub>	Nilai <i>p</i>	Q <sup>2</sup>	Nilai <i>p</i>
PM vs control	(+)	0.918	0.0005*	0.985	0.002*
	(-)	0.96	0.0005*	0.989	0.001*
PM+250GP vs PM	(+)	0.906	0.0005*	0.993	0.002*
	(-)	0.89	0.0515	0.979	0.02
PM+500GP vs PM	(+)	0.946	0.0005*	0.991	0.003*
	(-)	0.845	0.035*	0.973	0.027*
PM+ATV vs PM	(+)	0.966	0.0005*	0.995	0.001*
	(-)	0.941	0.0005*	0.988	0.0005*

\*Perubahan metabolit antara kumpulan adalah signifikan apabila nilai  $p < 0.05$ .

Q<sup>2</sup>: Varians diramalkan; R<sup>2</sup>: Varians dijelaskan

Singkatan: ESI (ionisasi elektro-semburan).

#### 4.16.1 Analisis Perubahan Lipatan

Analisis perubahan lipatan (FC) menunjukkan sebanyak 83 metabolit berpotensi dalam homogenat aorta tikus telah berubah yang dikesan daripada semua kumpulan kajian (Jadual 4.6). Perbandingan diantara kumpulan PM vs kawalan, menunjukkan sebanyak 21 metabolit berpotensi yang dikesan telah berubah dalam kumpulan PM kesan dari pengambilan diet tinggi lemak berbanding dengan kumpulan kawalan yang hanya menerima diet komersial. Daripada jumlah tersebut, 8 metabolit mengalami peningkatan FC manakala 13 metabolit lagi mengalami penurunan FC.

Sebaliknya, sebanyak 15 metabolit telah didapati berubah diantara kumpulan pascamenopaus yang menerima suplemen ekstrak *Gynura procumbens* (PM+250GP vs PM). Sebanyak 10 metabolit berpotensi mengalami peningkatan FC serta 5 metabolit mengalami penurunan FC. Terdapat juga perubahan pada metabolit yang ditunjukkan daripada kumpulan pascamenopaus yang diberi ekstrak *Gynura procumbens* pada dos

500 mg/kg (PM+500GP vs PM). Perubahan ini melibatkan 26 metabolit berpotensi yang mana 11 daripadanya mengalami peningkatan dan 15 metabolit mengalami penurunan FC. Selebihnya, dikesan dalam kumpulan PM+ATV iaitu sebanyak 11 metabolit di mana 7 metabolit mengalami peningkatan FC dan 4 mengalami penurunan lipatan perubahan. Kesemua metabolit yang mengalami perubahan lipatan disenaraikan dalam Jadual 4.7 dan digunakan untuk analisis tapak jalan.

Diantara metabolit berpotensi yang penting berdasarkan kajian lepas dalam kumpulan PM berbanding kawalan adalah asid 20-hidroksikosatetraenoik (20-HETE), 2-metoksiestradiol (2-ME), lipoksin A5 (LXA5), asid L-glutamik, 5-Oksoprolina, S-adenosilmetiona (SAM), kolina, glutation terturun (GSH), sfinganina, glutation teroksidasi (GSSG), fosfatidilgliserol, glukosa-6-fosfat, lysoPE (0:0/18.0), lysoPE (16:0) dan lysoPE (22:4).

Metabolit-metabolit ini ada yang berubah dan ada yang masih kekal tahap pengekspresannya pada kumpulan perbandingan yang lain. Terutamanya metabolit 20-HETE, 2-ME, LXA5, GSH dan GSSG yang dilihat menunjukkan kesan berbalik dalam kumpulan pascamenopaus yang diberi suplemen ekstrak *Gynura procumbens* (PM250GP vs PM dan PM500GP vs PM). Kumpulan tikus yang diberi rawatan statin (PM+ATV) juga menunjukkan perubahan pada metabolit GSH dan GSSG. Senarai Perubahan profil metabolik aorta tikus bagi kumpulan PM vs kawalan, PM+250GP vs PM, PM+500GP vs PM dan PM+ATV vs PM ditunjukkan pada Jadual 4.7.

Jadual 4.6 Bilangan perbezaan metabolit (DEMs) yang dikesan melalui perbandingan antara kumpulan

Perbandingan antara kumpulan	Perbezaan metabolit (DEMs)		Jumlah	Dikenal pasti	Tidak dikenal pasti
	ESI (+)	ESI (-)			
PM vs kawalan	16	49	65	21	44
PM+250GP vs PM	11	64	75	15	60
PM+500GP vs PM	20	13	33	26	59
PM+ATV vs PM	8	44	52	11	41

Jadual 4.7 Perubahan profil metabolik aorta tikus bagi kumpulan PM vs kawalan, PM+250GP vs PM, PM+500GP vs PM dan PM+ATV vs PM

<b>PM vs kawalan</b>					
<b>Metabolit berpotensi</b>	<b>m/w (Da)</b>	<b>RT (min)</b>	<b>Tanda pengenalan</b>	<b>ESI</b>	<b>FC</b>
Asid 20-hidroksikosatetraenoik (20-HETE)	320.473	19.3	HMDB0005998	+	↑ 7.18
2-metoksiestradiol (2-ME)	302.424	4.75	HMDB0000405	+	↑ 3.4
Lipoksin A5	352.465	9.9	HMDB0004385	+	↑ 5.28
Asid L-glutamik	147.053	0.59	HMDB0000148	-	↑ 3.81
Asid oksalasetik	132.072	8.62	HMDB0000223	-	↑ 5.9
5-Oksoprolina	129.043	9.8	^417	-	↑ 7.9
Hidroksibutirilkarnitin	247.288	4.85	LMDB00580	+	↓ 2.3
S-Adenosilmetionina (SAM)	398.137	0.54	HMDB0062709	-	↑ 16.3
Glutation (GSH)	307.083	0.90	HMDB0000125	-	↓ 4.4
Sfinganina	301.298	6.70	HMDB0000269	+	↓ 5.2
Glutation teroksidasi (GSSG)	612.152	1.69	HMDB0003337	+	↓ 1.3
Fosfatidilgliserol	246.049	0.61	*186	+	↓ 1.8
Glukosa-6-fosfat	260.029	0.56	HMDB0001401	+	↓ 3.7
LisoPE (0:0/18:0)	481.316	6.61	LMGP02050038	+	↓ 5.0
LisoPE (16:0)	453.284	13.46	HMDB0011473	+	↓ 3.3
Propionil-L-karnitina	217.132	1.78	HMDB0000824	+	↓ 2.1
Guanosina	283.092	1.92	HMDB0000133	+	↓ 2.0
Prolina betaina	143.095	0.89	HMDB0004827	+	↓ 2.0
Leusilprolina	228.292	1.7	HMDB0011175	-	↓ 1.9
Kolina	104.171	2.75	HMDB0000097	-	↑ 4.6
LisoPE (22:4)	529.317	8.25	LMGP02050014	+	↓ 8.1
<b>PM+250GP vs PM</b>					
Asid 20-hidroksikosatetraenoik (20-HETE)	320.473	19.3	HMDB0005998	+	↓ 4.5
2-metoksiestradiol (2-ME)	302.424	4.75	HMDB0000405	+	↓ 1.9
Lipoksin A5	352.465	9.9	HMDB0004385	+	↓ 2.3
Asid L-glutamik	147.053	0.59	HMDB0000148	-	↑ 4.2
Asid linoleik	278.430	10.7	LMDB00326	+	↓ 10.2
Xantosina	284.080	1.35	^1429	+	↑ 3.4
Adenosina trifosfat	507.181	13.6	HMDB0000538	-	↑ 3.5
Glutation (GSH)	307.083	0.90	HMDB0000125	-	↑ 7.3
Glutation teroksidasi (GSSG)	612.152	1.69	HMDB0003337	+	↑ 5.9
6-fosfat glukosa	260.1358	3.71	HMDB0001401	+	↑ 3.9
Glutamida aspartin	262.218	4.9	HMDB0028752	-	↑ 3.2
Sfinganina	301.298	6.70	HMDB0000269	+	↑ 4.7
Sfingosina	299.283	9.1	^418	-	↑ 4.8
(24R)-koles-5-ene-3-beta,7-alfa,24-triol	418.652	6.3	HMDB0011644	-	↓ 8.1
Asid 3'-adenilik (3'-AMP)	347.221	10.4	HMDB0003540	+	↑ 1.6

bersambung...

...sambungan

<b>PM+500GP vs PM</b>					
Guanina	151.126	7.1	HMDB0000132	+	↑ 3.71
Asid urik	168.027	2.8	^753	+	↓ 2.2
D-Lisin	146.19	3.1	HMDB0003405	+	↑ 10.3
Asid aminomalonik	119.076	1.7	HMDB0001147	+	↓ 2.5
Asid sibasik	202.247	19.5	HMDB0000792	-	↓ 9.1
Metilmelonik	118.088	5.62	HMDB0000202	-	↑ 3.6
Glutation (GSH)	307.083	0.90	HMDB0000125	-	↑ 7.1
Glutation teroksidasi (GSSG)	612.152	1.69	HMDB0003337	+	↑ 1.2
Asid 20-hidroksikosatetraenoik (20-HETE)	320.473	19.3	HMDB0005998	+	↓ 3.6
2-metoksiestradiol (2-ME)	302.424	4.75	HMDB0000405	+	↓ 2.84
Lipoksin A5	352.465	9.9	HMDB0004385	+	↓ 4.8
Sitrik asid	192.124	4.5	HMDB0000094	+	↑ 7.18
Adenosina trifosfat	507.181	7.8	HMDB0000538	+	↓ 3.4
Cer(d17:1/18:0)	551.941	11.2	HMDB0240683	-	↓ 5.28
L-Fenilalanina	165.079	2.09	^8	+	↓ 5.5
Asid (S)-2-metilbutanoik	102.132	1.32	HMDB0033742	+	↓ 3.2
4 $\alpha$ -karboksi-5 $\alpha$ -kolesta-8-en-3 $\beta$ -ol	430.673	7.5	HMDB0062386	-	↓ 10.3
Asid asetik	60.052	1.63	LMDB00014	-	↑ 4.8
Kreatina	113.118	3.47	LMDB00180	+	↓ 8.1
Ornitina	132.161	4.81	LMDB00099	+	↑ 3.6
SM(d17:1/18:0)	717.07	16.28	HMDB0240620	-	↓ 4.5
Niasinamida	122.1246	2.86	HMDB0001406	-	↓ 1.3
L-Alanina	89.093	1.39	HMDB0000161	+	↑ 7.18
Asid linoleik	278.430	10.7	LMDB00326	+	↓ 3.4
Adenosina monofosfat (AMP)	347.062	10.4	HMDB0000045	+	↑ 3.6
LisoPE (0:0/18:0)	481.316	6.61	LMGP02050038	+	↑ 5.0
<b>PM+ATV vs PM</b>					
S-adenosilmetionina (SAM)	398.137	0.54	HMDB0062709	-	↓ 2.2
Asid L-glutamik	129.043	0.32	HMDB0000148	+	↑ 3.2
Glutation (GSH)	307.083	0.90	HMDB0000125	-	↑ 3.6
Liso PE (20:4)	501.5931	2.94	HMDB0011517	-	↑ 6.1
Liso PA(O-18:0/0:0)	424.559	2.88	HMDB0011144	+	↑ 5.2
Liso PC(22:0/0:0)	579.790	6.18	HMDB0010398	+	↑ 7.6
5-Oksoprolina	129.043	9.8	^417	-	↓ 7.9
Asid 4-piridosik	183.161	3.2	HMDB0000017	-	↓ 3.3
Glutation teroksidasi (GSSG)	612.152	1.69	HMDB0003337	+	↑ 1.3
Asid kolik	408.287	6.71	HMDB0000619	-	↑ 5.28
Kolesterol	386.654	4.71	HMDB0000067	+	↓ 3.3

Metabolit yang berpotensi telah dikenalpasti melalui rujukan silang pada pangkalan data Human Metabolome Database (HMDB), Metlin (\*), LIPID MAPS (LM) and mzCloud (^).

Simbol: (↑) meningkat; (↓) menurun.

Singkatan: ESI (ionisasi elektro-sembruran); FC (perubahan lipatan); m/w (berat molekul); RT (masa retensi); min (minit).

#### 4.16.2 Analisis Tapak Jalan

Senarai tapak jalan yang terkesan dalam kajian ini ditunjukkan dalam Jadual 4.8. Laluan tapak jalan yang disenaraikan dianggap relevan kerana mempunyai nilai impak tapak jalan yang menghampiri atau melebihi 0.1 seperti yang dilaporkan pada modul “Pathway Analysis” dalam Rajah 4.30. Warna dan saiz bulatan yang ditunjukkan pada analisis topologi tapak jalan adalah didasarkan pada nilai  $p$ . Bulatan warna kuning menunjukkan nilai  $p$  yang lebih tinggi berbanding bulatan berwarna merah (nilai  $p$  yang rendah). Nilai impak laluan menunjukkan semakin besar bulatan semakin tinggi skor impak yang dihitung dari analisis topologi mengikut kumpulan masing-masing.

Analisis tapak jalan mendapati kumpulan tikus yang diberi diet tinggi lemak (kumpulan PM) menyebabkan beberapa tapak jalan biokimia telah terkesan antaranya adalah metabolisme asid arakidonik, arginina dan prolina, glutathione, nikotina dan nikotimida serta gliserofosfolipid berbanding dengan kumpulan kawalan.

Tapak jalan lain yang terkesan dengan suplemen ekstrak *Gynura procumbens* berbanding kumpulan PM adalah metabolisme kolesterol, glutathione, asid arakidonik, nikotina dan nikotimida, gula amino dan nukleotida, biosintesis hempedu utama, piruvat, galaktosa, laluan pentosa fosfat, pirimida, alanin, aspartat dan glutamat serta biosintesis fenilalanina, tirosina dan triptofan.

Tapak jalan yang terlibat dalam kumpulan pascamenopaus yang diberi rawatan statin (PM+ATV vs PM) pula adalah metabolisme glutathione, tirosina, gliserofosfolipid, arginina dan prolina, kolesterol,  $\beta$ -alanina dan vitamin B6.

Diantara kesemua tapak jalan yang disenaraikan, tapak jalan metabolisme glutathione dan asid arakidonik didapati berubah dengan suplemen ekstrak *Gynura procumbens*.

Jadual 4.8 Senarai tapak jalan yang terkesan dalam kumpulan PM vs kawalan, PM+250GP vs PM, PM+500GP vs PM dan PM+ATV vs PM

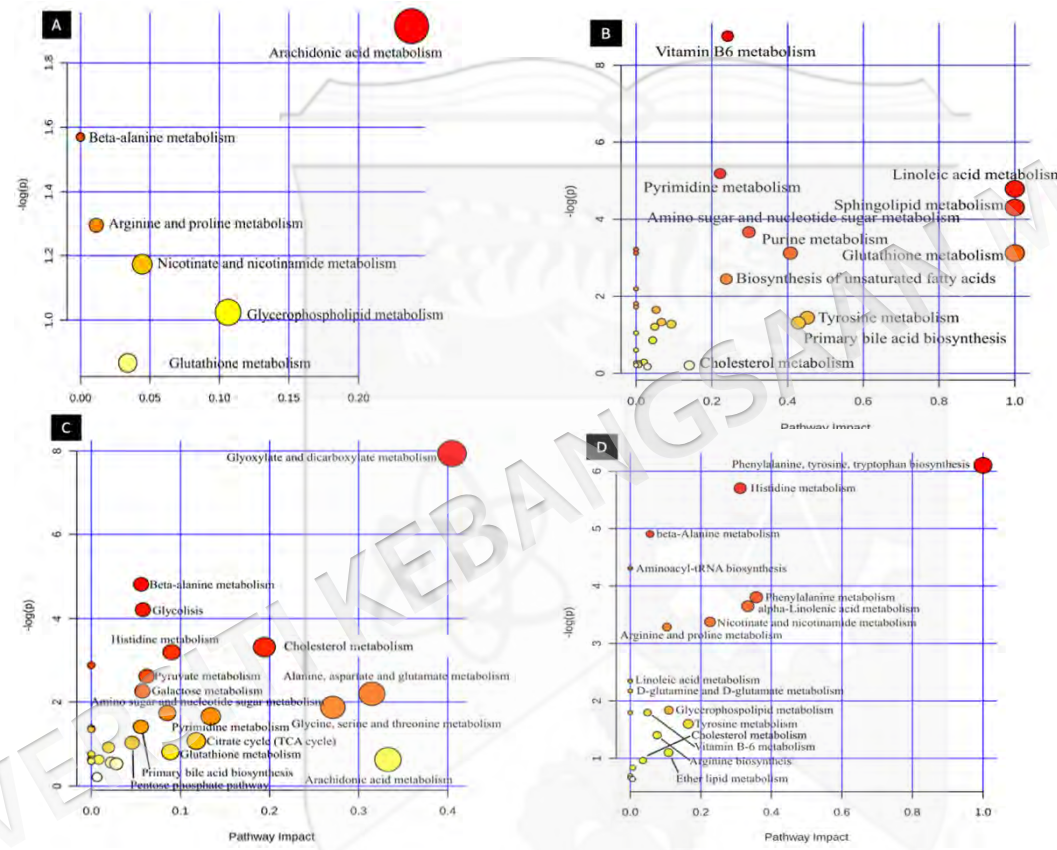
<b>Kumpulan</b>	<b>Tapak jalan</b>	<b>Impak</b>	
PM vs kawalan	Metabolisme asid arakidonik	0.28	
	Metabolisme arginina dan prolina	0.02	
	Metabolisme glutathion	0.03	
	Metabolisme nikotina dan nikotimida	0.04	
	Metabolisme gliserofosfolipid	0.12	
	Metabolisme asid linolik	1.0	
	Metabolisme sfingolipid	1.0	
	Metabolisme glutathion	1.0	
	Metabolisme tirosina	0.42	
PM+250GP vs PM	Biosintesis asid hempedu utama	0.41	
	Metabolisme purina	0.4	
	Metabolisme gula amino dan gula nukleotida	0.3	
	Metabolisme vitamin B6	0.22	
	Metabolisme pirimida	0.22	
	Metabolisme kolesterol	0.17	
	Metabolisme glikosilat dan dikarbosilat	0.4	
	Metabolisme asid arakidonik	0.33	
	Metabolisme alanina, aspartat dan glutamat	0.31	
	Metabolisme pirimidina	0.13	
	PM+500GP vs PM	Kitaran sitrat	0.12
		Metabolisme histidina	0.09
		Metabolisme glutathion	0.09
Metabolisme piruvat		0.05	
Metabolisme galaktosa		0.05	
Metabolisme kolesterol		0.2	
Biosintesis asid hempedu utama		0.05	
Laluan pentosa fosfat		0.03	
Metabolisme gula amino dan gula nukleotida		0.27	
Biosintesis fenilalanina, tirosina dan triptofan		1.0	
Metabolisme fenilalanina		0.39	
Metabolisme taurina dan hipotaurina		0.43	
Metabolisme asid arakidonik		0.38	
Metabolisme glisina, serina dan treonina		0.30	
Metabolisme nikotina dan nikotimida		0.21	
Metabolisme tirosina		0.19	
Metabolisme gliserofosfolipid		0.15	

bersambung...

...sambungan		
PM+ATV vs PM	Metabolisme tirosina	0.19
	Metabolisme gliserofosfolipid	0.15
	Metabolisme argina dan prolina	0.14
	Metabolisme lipid eter	0.14
	Biosintesis argina	0.13
	Metabolisme kolesterol	0.11
	Metabolisme $\beta$ -alanina	0.12
	Metabolisme vitamin B6	0.12
	Metabolisme glutation	0.1

---





Rajah 4.30 Analisis tapak jalan menunjukkan laluan metabolik yang terkesan bagi: (A) PM vs kawalan, (B) PM+250GP vs PM, (C) PM+500GP vs PM dan (D) PM+ATV vs PM

## BAB V

### PERBINCANGAN

Kajian ini memilih untuk menggunakan 80% etanol sebagai sebatian pengekstrakan *Gynura procumbens* adalah berdasarkan kajian oleh Murugaiyah (2018) yang membuat perbandingan diantara 95%, 75%, 50% dan 25% etanol dan mendapati ekstrak yang terhasil dengan pengekstrakan 75% etanol mampu menurunkan aras kolesterol dlm darah manakala ekstrak 50% etanol pula menurunkan jumlah triasilgliserida (Murugaiyah et al., 2018). Selain itu, permintaan pihak penaja kajian juga merupakan sebab 80% etanol digunakan. Oleh itu, 80% etanol dipilih sebagai dos efektif untuk pengekstrakan *Gynura procumbens*.

Beberapa kajian lepas telah dijalankan untuk mengenal pasti sifat antioksidan dan anti-inflamasi ekstrak etanol *Gynura procumbens* yang melibatkan komponen bioaktif seperti flavonoid, asid fenolik, glikosida, terpenoid dan sterol (Liu et al. 2010; Mou & Dash 2016). Kajian lain pula melaporkan komponen bioaktif ekstrak *Gynura procumbens* lain adalah seperti asid klorogenik (CGA), asid galik, kaempferol, kuersertin dan rutin (Rosidah et al. 2008). Diantara kesemua komponen yang dikenalpasti, CGA merupakan komponen bioaktif sepunya yang konsisten dikesan dalam ekstrak *Gynura procumbens* yang dilaporkan sebelum ini.

CGA mempengaruhi metabolisme kolesterol dengan mengurangkan pembentukan kolesterol misel pada saluran pencernaan, meningkatkan aliran hempedu, kolesterol hempedu, kepekatan asid hempedu dan perkumuhan kolesterol dalam bentuk steroid (Afonso et al. 2013; Meng et al. 2013). Selain itu, CGA juga menunjukkan keupayaan untuk merawat penyakit obesiti, hiperlipidemik dan ketahanan insulin (fa/fa) dalam tikus Zucker. Kajian tersebut juga mendapati penurunan aras kolesterol dan triasilgliserol pada plasma, hepar dan limpa tikus Zucker apabila dirawat dengan CGA.

Dapatan ini mencadangkan, CGA mampu meningkatkan toleransi glukosa serta mengurangkan aras lipid dalam plasma dan hati (De Sotillo & Hadley 2002). Selain itu, CGA juga tidak mendorong keadaan hipoglisemia yang berterusan dan menurunkan aras puncak glukosa apabila dibandingkan dengan kumpulan tikus yang sama sebelum mendapat rawatan asid klorogenik (Tajik et al. 2017).

Kajian lain menunjukkan CGA pada dos 30 dan 60 mg/kg/hari yang diberi secara oral selama 14 hari mampu mengurangkan aras triasilgliserol hati dengan menghalang penyerapan lemak serta mengaktifkan metabolisme lemak hati (Shimoda et al. 2006). Penemuan serupa yang dilaporkan oleh Karthikesan et al. (2010) mencadangkan bahawa CGA mampu menurunkan aras LDL dan enzim semasa metabolisme lipid pada tikus diabetes melitus jenis-2 aruhan STZ-nikotinamida. Penemuan ini mungkin menyebabkan tekanan darah kembali ke julat normal (Ruano et al. 2005). CGA menurunkan kolesterol dan lemak pada hati dengan mengawal atur ekspresi gen PPAR- $\alpha$  pada tikus hiperkolesterolemia (Wan et al. 2013). Cho et al. (2010) pula melaporkan CGA sebagai komponen anti-obesiti dalam memperbaiki metabolisme lipid pada tikus obes yang diberi diet tinggi lemak. Pengambilan *Gynura procumbens* untuk jangka masa yang panjang dicadangkan sebagai agen penurun lipid yang baik (Murugaiyah et al. 2018) dan mampu menurunkan risiko aterosklerosis.

Eriositrin yang telah dikenal pasti dalam ekstrak *Gynura procumbens* juga dilaporkan mempunyai sifat penurun-lipid kerana ia memperbaiki keadaan dislipidemia dan mengurangkan titik lipid dalam hati ikan Zebra (Hamburger 2016; Miyake et al. 2006). Kebanyakan komponen yang dikenal pasti dalam kajian oleh Ahmad Nazri et al. (2019) adalah daripada asid lemak politaktepu (PUFA) yang dilaporkan mempunyai kesan kardioprotektif (Davinelli et al. 2018). Asid lemak politaktepu dari sumber semula jadi dikaitkan dengan keupayaan menurunkan aras LDL pada wanita obes (Stelmach-Mardas et al. 2014).

Berat badan tikus pascamenopaus yang meningkat pada bulan ke-3 dan ke-6 adalah kesan daripada pengambilan makanan tinggi lemak selama 24 minggu. Hasil ini disokong dalam kajian lain yang menunjukkan diet kolesterol 2% yang diperkaya dengan 5HPO meningkatkan kadar pengambilan makanan oleh tikus dan seterusnya

meningkatkan berat badan tikus kajian (Leong et al. 2008). Tikus yang diberi diet lemak berpotensi untuk mengalami hiperfagia iaitu peningkatan selera makan secara berlebihan disebabkan oleh kecederaan pada hipotalamus (McNay & Speakman 2013). Perubahan kualiti diet juga mempengaruhi kadar pengambilan makanan oleh tikus pascamenopaus. Walaupun diet yang dicampur dengan minyak sawit berulang kali menurunkan kualiti makanan dengan mengubah rasa, tekstur dan bau, namun ia tidak menjejaskan pengambilan makanan oleh tikus (Ghobadi et al. 2018).

Peningkatan berat badan tikus pascamenopaus mungkin juga disebabkan oleh prosedur ovariectomi yang dilakukan di awal eksperimen (Behr et al. 2012). Ini adalah kerana hormon estradiol memainkan peranan penting dalam mengawal kadar pengambilan makanan dikalangan wanita (Ding et al. 2017; Richard et al. 2017). Penurunan aras hormon estrogen ketika pascamenopaus menyebabkan aras leptin dalam hipotalamus berkurang dan menyebabkan tubuh gagal untuk mengawal pengambilan makanan, lalu mengakibatkan pengumpulan lemak serta menyebabkan pertambahan pada berat badan (Hirschberg 2012; Torto et al. 2006).

Suplementasi *Gynura procumbens* pada dos 250 dan 500 mg/kg menurunkan berat badan tikus pascamenopaus yang diberi diet tinggi lemak. Penurunan ini mungkin disebabkan oleh konstituen flavonoid dan fenolik yang terkandung dalam ekstrak *Gynura procumbens* (Kaewseejan et al. 2015). Penemuan kajian ini selari dengan kajian sebelumnya yang melaporkan bahawa sebatian flavonoid dan fenolik mempunyai kaitan dengan penurunan aras leptin atau rangsangan terhadap ghrelin dan peptida YY (PYY) dalam makanan tinggi lemak (Abdulazeez et al. 2019).

Pengambilan diet tinggi lemak turut memberikan kesan terhadap tekanan darah sistolik dalam kajian ini dan turut diperhatikan dalam kajian lain (Thomaz et al. 2020). Tekanan darah meningkat bermula seawal bulan pertama hingga ke akhir kajian (24 minggu). Pemerhatian ini adalah kekal dengan kajian oleh Adam et al. (2007).

Tekanan darah sistolik meningkat dengan pengambilan diet kolesterol 2% dan 5HPO mungkin disebabkan oleh beberapa faktor. Proses ulangan pemanasan minyak sawit sebanyak lima kali menyebabkan pengoksidaan lipid (Srinivasan & Pugalendi 2000) dan produk seperti hidroperoksida dan spesis oksigen reaktif (ROS) yang terhasil

boleh mengaruh inflamasi serta mendatangkan kesan mudarat terhadap fungsi kardiovaskular seperti meningkatkan risiko hipertensi (Touyz 2004). Proses pengoksidaan ini, turut meningkatkan aras kolesterol LDL dan aras kolesterol jumlah (TC) plasma pada tikus Sprague Dawley (Osime et al. 1996).

Pemberian ekstrak *Gynura procumbens* pada dos 250 dan 500 mg/kg menurunkan tekanan darah sistolik kumpulan tikus pascamenopaus pada bulan ke-3 dan ke-6. Hasil ini disokong dengan kajian terdahulu yang melaporkan bahawa ekstrak *Gynura procumbens* menyekat terusan kalsium dan seterusnya menyebabkan vasodilatasi pada tikus hipertensi spontan (SHR) (Hoe et al. 2011; Kaur et al. 2013). Ekstrak *Gynura procumbens* mungkin mempunyai kesan ke atas fungsi sel endotelium dengan menurunkan jumlah rintangan periferi pada saluran darah (Leong et al. 2009). Asid fenolik dalam ekstrak *Gynura procumbens* dicadangkan berupaya mengurangkan TC dan aras kolesterol LDL serta meningkatkan HDL (Corbi et al. 2018). Oleh itu, penurunan tekanan darah berkait dengan pengaruh metabolisme kolesterol.

Kajian analisis morfologi dijalankan pada tisu aorta torasik tikus kerana bahagian tersebut adalah paling sensitif terhadap sebarang perubahan hemodinamik dalam salur darah (Kleinstreuer et al. 2001). Pemerhatian pada morfologi aorta menunjukkan tiada pembentukan lesi aterosklerosis yang jelas kelihatan pada kesemua bahagian tisu aorta tikus pascamenopaus. Namun yang dapat dilihat adalah penebalan pada tunika media (TM) akibat prosedur ovariectomi yang dijalankan dalam kajian ini. Ini mungkin disebabkan tikus adalah lebih rentan terhadap aterosklerosis berbanding arnab (Jaarin et al. 2006). Oleh itu, kajian histomorfometrik dijalankan pada tisu aorta untuk melihat perubahan pada struktur tisu.

Kajian histomorfometrik pula mendapati pengambilan makanan tinggi lemak yang mengandungi minyak masak dipanaskan berulang kali menyebabkan peningkatan pada ketebalan intima-media (IM) dalam pembentukan aterosklerosis tahap awal (Siti et al., 2017). Inflamasi bermula di tunika adventisia (TA) dan merebak ke dalam ke dalam kawasan salur darah (Maiellaro dan Taylor, 2007). Pemerhatian melalui pewarnaan Verhoeff-van Gieson (VvG) menunjukkan penebalan tunika media (TM) berlaku mungkin disebabkan adanya kerosakan pada aorta kumpulan pascamenopaus

kesan daripada pengambilan makanan tinggi lemak. Dapatan yang serupa juga dilihat pada kajian terdahulu yang menunjukkan gangguan yang ketara pada ketebalan TM dan IM akibat pengumpulan kolesterol yang tinggi dan pembentukan sel busa pada lapisan TI (Baruscotti et al., 2010) semasa pembentukan aterosklerosis subklinikal (Targher et al., 2006). Walaubagaimanapun, dapatan kajian kami bertentangan dengan kajian sebelum ini yang melaporkan ketebalan tunika berlaku hanya pada bahagian intima yang disebabkan oleh kehadiran sel busa pada awal pembentukan aterosklerosis (Castro et al., 2009).

Pemberian ekstrak *Gynura procumbens* dilihat mampu mengekalkan struktur aorta yang hampir menyerupai struktur aorta tikus kawalan. Kajian ini mencadangkan kehadiran flavonoid, seperti rutin, kaempferol dan kuersertin yang terkandung dalam ekstrak *Gynura procumbens* mempunyai kesan penghambatan pada sitokin proinflamasi; TNF- $\alpha$ , IL-6, dan NO (Saraphanchotiwitthayaa dan Sripalakitb, 2015).

Pewarnaan ORO menunjukkan pengumpulan titik lipid (kolesterol) yang ketara pada tunika media tikus pascamenopaus. Pemerhatian ini mencadangkan bahawa kehilangan estrogen mungkin mempengaruhi jumlah pengumpulan lipid melalui penghambatan ekspresi reseptor estrogen nuclear iaitu ER $\alpha$  dan ER $\beta$  yang tinggi dalam sel endotelium serta sel otot licin (Saltiki & Alevizaki 2007). Estrogen reseptor alfa dan beta kemungkinan menyebabkan titik lipid menjadi tidak stabil iaitu kesan daripada aktiviti pembentukan pembuluh baru oleh estrogen (Mcrobb et al. 2017). Pengumpulan titik lipid adalah normal dalam tisu. Walau bagaimanapun, pengumpulan titik lipid yang berlebihan dalam tisu boleh menjadi petunjuk kekurangan metabolik atau faktor patogenesis (Xu et al. 2018). Pemberian ekstrak *Gynura procumbens* pada kedua-dua dos (250 dan 500 mg/kg) menunjukkan potensi yang tinggi dalam pengurangan titik lipid.

Ujian fungsi hepar dan ginjal dalam serum dilakukan untuk memastikan *Gynura procumbens* tidak toksik dan selamat untuk diambil sebagai suplemen. Dapatan kajian ini menunjukkan ekstrak *Gynura procumbens* menurunkan bacaan jumlah protein, albumin, globulin, bilirubin, ALP, AST, ALT dan GGT (hepar) urea, asid urik kreatinine, eGFR dan BUN (ginjal) tikus pascamenopaus ke julat normal sekaligus

menunjukkan kesan perlindungan terhadap kerosakan tisu dan organ haiwan. Dapatan ini mencadangkan bahawa ekstrak *Gynura procumbens* adalah selamat walaupun pada dos yang lebih tinggi dan tidak mempunyai ketoksikan akut (Akhi et al. 2019; Evenamede et al. 2019).

Dalam kajian ini, aras kolesterol (TC), TG dan LDL tikus pascamenopaus menunjukkan peningkatan disebabkan oleh pengambilan diet kolesterol 2% dan minyak masak dipanaskan berulang kali (5HPO). Kesan daripada pengambilan diet kolesterol, aras lipoprotein berketumpatan tinggi (HDL) menurun secara signifikan berbanding kawalan. Aras triasilgliserol (TG) yang tinggi merupakan penanda kepada lipoprotein aterogenik terutama sekali terhadap pesakit penyakit kardiovaskular. Peningkatan aras TG dan penghasilan asid lemak bebas dalam serum pesakit sindrom metabolik menyumbang kepada pengumpulan dan perembesan lipoprotein berketumpatan rendah. TG juga bergabung dengan partikel sisa aterogenik dan apo C-III yang boleh dijumpai dalam plasma lipoprotein (Talayero & Sacks 2011; Miller et al 2011).

Aras triasilgliserol yang tinggi disebabkan oleh pertukaran komponen kolesteril ester antara lipoprotein berketumpatan sangat rendah (VLDL) dan LDL seterusnya menjalani proses lipolisis untuk LDL dipecahkan menjadi partikel yang lebih kecil dan tumpat dan seterusnya meningkatkan risiko untuk terdedah kepada modifikasi oksidatif (Kwiterovich 2002; Nicholls & Lundman 2004). Tambahan lagi, aras TG yang tinggi turut menurunkan aras HDL dalam serum darah selain daripada meningkatkan penghasilan sisa lipoprotein dan LDL yang kecil dan mengaruh proliferasi intima, pembentukan aterosklerosis serta menggalakkan proses trombogenesis untuk berlaku (Miller et al 2011).

Penurunan aras HDL dalam kajian mungkin berkait dengan pembentukan aterosklerosis pramatang. Lipoprotein berketumpatan tinggi (HDL) menghalang atau memusnahkan pembentukan LDL yang diperolehi daripada fosfolipid yang telah teroksida (Watson et al 1995). Kapasiti efluks kolesterol HDL berkait rapat dengan kehadiran aterosklerosis (Khera et al 2011). Efluks kolesterol adalah langkah pertama dalam proses pengangkutan kolesterol berbalik yang dijalankan oleh HDL dengan menghantar lebih kolesterol sel dalam tisu periferi ke hati untuk perkumuhan

hempedu (Rader et al 2009). HDL juga mempunyai peranan penting dalam kolesterol berbalik dalam makrofaj dan dapat melindungi daripada pembentukan aterosklerosis (El Harchaoui et al 2009; Vergeer et al 2010). Kajian lain juga mendapati perunan HDL mungkin disebabkan aras HDL-terikat klusterin yang rendah pada pesakit arteri koronari melalui pengaktifan protein Bcl-2 yang terlibat dalam tapak jalan pro-apoptosis (Riwanto et al 2013). Peningkatan aras LDL dalam serum dikaitkan dengan pembentukan aterosklerosis kerana aras LDL yang tinggi menggalakkan kemasukan LDL ke dalam tunika intima dan seterusnya dioksidakan dan mengaruh pembentukan aterogenesis (Khatana et al. 2020).

Aktiviti enzim antioksidan seperti CAT, GPx dan SOD eritrosit menurun pada tikus menopause diberi diet tinggi lemak. Pengurangan aktiviti CAT, GPx dan SOD adalah disebabkan oleh penghasilan anion peroksida dan hidrogen peroksida yang berlebihan (Ojha et al. 2010). Katalase dan superoksida dismutase adalah enzim penting sebagai agen penurun dalam mengekalkan integriti sel membran (Adwas et al. 2019). Enzim SOD adalah penting untuk memangkin pertukaran anion superoksida yang terhasil dari peroksida lipid kepada hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida yang terhasil adalah separa stabil. Ini kerana ia boleh ditukar kepada hidrogen peroksil yang lebih reaktif apabila terdapat ferum. Oleh itu, hidrogen peroksida perlu ditukarkan kepada molekul yang lebih stabil iaitu oksigen dan air. Penukaran hidrogen peroksida bukan sahaja dilakukan oleh enzim katalase, tetapi juga enzim GPx. Penukaran oleh GPx memerlukan glutation (Ighodaro & Akinloye 2018).

Glutation adalah antioksidan bukan enzim yang terdapat dalam badan. Ia bertindak balas dengan radikal superoksida dan oksigen singlet untuk membentuk glutation teroksida (GSSG). Kitaran pengoksidaan dan penurunan glutation ini merupakan tindak balas berbalik yang dimungkinkan oleh enzim GPx dan glutation reduktase. Pengambilan diet kolesterol 2% dicampurkan dengan minyak masak dipanaskan berulang kali (5HPO) telah menurunkan aktiviti GPx. Penurunan ini disebabkan oleh kekurangan glutation yang telah digunakan untuk meneutralkan spesies oksigen reaktif berlebihan yang terhasil (Patel et al. 2010).

Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* menurunkan aras MDA plasma dan meningkatkan aras enzim antioksidan. Suplementasi *Gynura procumbens* didapati merencatkan peroksidasi lipid serta menghalang pembentukan MDA plasma (Ahmad Nazri et al. 2019). *Gynura procumbens* mempunyai keupayaan untuk merencat peroksidasi lipid (Puangpronpitag et al. 2010). Hal ini dikaitkan dengan sifat antioksidan *Gynura procumbens* dalam menentang ROS yang terhasil.

Suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* meningkatkan aktiviti enzim antioksidan (CAT, GPx, dan SOD) dalam kajian ini. Flavonoid dan asid fenolik yang terkandung dalam *Gynura procumbens* terbukti dapat melindungi eritrosit daripada kerosakan oksidatif dengan memodulasi aktiviti enzim antioksidan (Khan et al. 2016). Sebatian ini bertindak sebagai pemulih radikal bebas untuk menstabilkan sistem pertahanan. Para pengkaji memberi teori mengenai kemampuan antioksidan yang boleh memecahkan rantai peroksidasi lipid dengan cara membaiki dan mengganti lipid (Vasanthi et al. 2012).

Pemberian *Gynura procumbens* juga dapat meningkatkan enzim antioksidan seperti CAT dan SOD. Keputusan ini menunjukkan persamaan dengan hasil kajian lalu, apabila sifat antioksidan pada ekstrak akueus daun *Gynura procumbens* dengan dos 400 mg/kg mampu menurunkan aras glukosa dalam darah serta meningkatkan aktiviti enzim SOD dan CAT dalam tikus diabetik aruhan-STZ (Dandu & Inamdar 2009). Berlainan dengan penemuan kajian oleh Zhang dan Tan (2000), ekstrak *Gynura procumbens* menurunkan aras peroksidasi lipid melalui peningkatan SOD dan CAT tetapi tidak menunjukkan perubahan pada aras glukosa dalam darah. Dalam kajian lain, astragalin, salah satu komponen bioaktif yang ditemui dalam ekstrak *Gynura procumbens* menunjukkan keupayaan untuk membaiki kesan buruk radikal bebas pada aktiviti GPx dan SOD yang disebabkan oleh endoktoksin melalui modulasi rangkaian isyarat LPS-TLR (Riaz et al. 2018).

Dalam kajian ini, pengambilan diet kolesterol tinggi yang diperkaya dengan 5HPO melemahkan respon relaksasi cecincin aorta tikus pascamenopaus aruhan Ach dan SNP. Hal ini adalah kerana aktiviti vasorelaksasi aruhan Ach adalah bersandar kepada endotelium. Pembebasan nitrik oksida (NO) daripada endotelium

dirangsangkan oleh bahan vasoaktif farmakologi termasuk Ach (Yam et al. 2016). Disebabkan itu, NO berperanan penting dalam menentukan keseimbangan antara kontraksi dan relaksasi otot licin salur darah (Pérez-Guerrero et al. 2000). Walau bagaimanapun, peratusan respon vasorelaksasi aruhan SNP masih melebihi peratusan respon vasorelaksasi aruhan Ach.

Natrium nitroprusida bertindak sebagai agen vasodilatasi tidak bersandar endotelium. Pemecahan molekul SNP secara spontan menghasilkan NO. Mekanisme SNP adalah serupa dengan NO yang dibebaskan daripada endotelium atas rangsangan Ach. Nitrik oksida meresap ke dalam sel otot licin salur darah untuk mengaktifkan guanilate siklase jenis larut (sGC). Peningkatan aktiviti siklik guanosin monofosfat (cGMP) menyebabkan relaksasi otot licin salur darah (Wang et al. 2019). Penyekatan tapak jalan pengisyaratan NO-cGMP atau pengurangan dalam penghasilan cGMP mungkin menyumbang kepada perencatan vasorelaksasi berikutan pengambilan diet tinggi kolesterol diperkaya minyak yang dipanaskan berulang kali (5HPO).

Pengambilan diet tinggi kolesterol diperkaya minyak yang dipanaskan berulang kali (5HPO) meningkatkan kontraksi respon cecincin aorta aruhan PE. Respon vasokonstriksi adalah lebih tinggi pada tikus pascamenopaus yang menerima diet tinggi kolesterol diperkaya minyak yang dipanaskan berulang kali (5HPO). Fenilefrin adalah agonis pada reseptor  $\alpha_1$ -adrenergik. Peningkatan reaktiviti kontraksi vaskular menyumbang kepada peningkatan aktiviti vaskular (Touyz et al. 2018). Kajian Owu et al. (1998) melaporkan bahawa respon aorta tikus Wistar terjejas berikutan pengambilan diet kolesterol tinggi yang diperkaya dengan 5HPO selama 18 minggu. Hasil kajian mereka menunjukkan terdapat perencatan vasorelaksasi aruhan Ach dan peningkatan vasokonstriksi dalam cecincin aorta tikus Wistar. Namun, kajian ini tidak menggunakan PE sebagai agen untuk mengkaji respon kontraksi aorta sebaliknya menggunakan noradginjalin. Walaupun agen yang digunakan adalah berbeza, kesan pengambilan diet tinggi kolesterol diperkaya minyak yang dipanaskan berulang kali (5HPO) telah ditunjukkan pada aktiviti vasokonstriksi dan tekanan darah.

Respon vasokonstriksi terhadap PE yang meningkat dalam cecincin aorta tikus pascamenopaus mengubah mekanisme kontraksi otot licin aorta. Produk peroksidasi

lipid yang berkumpul dalam salur darah menyebabkan kecederaan endotelium. Kecederaan endotelium meningkatkan respon otot licin vaskular terhadap PE dan merencatkan vasorelaksasi aorta tikus. Perencatan relaksasi aorta mungkin dikaitkan dengan bahan bertoksik terbitan asid lemak semasa proses menyediakan 5HPO (Leong et al. 2009). Kehadiran bahan toksik dalam 5HPO yang dicampur dalam diet 2% kolesterol mengganggu aktiviti vaskular responsif saluran darah, meningkatkan rintangan saluran darah periferi total dan tekanan darah.

Dapatan kajian ini menunjukkan bahawa peratusan respon relaksasi aruhan ACh dan SNP meningkat dengan suplemen *Gynura procumbens* pada dos 250 dan 500 mg/kg berbanding respon relaksasi kumpulan pascamenopaus. Peningkatan respon relaksasi aruhan SNP mencadangkan kemungkinan suplemen ekstrak *Gynura procumbens* berkait dengan peningkatan sel otot licin vaskular (VSMCs) terhadap NO. Cadangan ini turut disokong dengan pemerhatian terhadap tikus kumpulan kawalan sham yang menerima suplemen ekstrak *Gynura procumbens* yang juga menunjukkan respon relaksasi yang tinggi (Ajay et al. 2003). Ini membuktikan bahawa *Gynura procumbens* mampu mempengaruhi VSMC secara langsung dan tidak dipengaruhi oleh kesan pengasingan sel endotelium. Pemberian suplemen *Gynura procumbens* juga mungkin menyebabkan respon vasorelaksasi dibaiki melalui pengaktifan saluran BKCa atau penghambatan saluran  $Ca^{2+}$ . Saluran BKCa bertindak sebagai penghambat tindak balas kemasukan  $[Ca^{2+}]_i$  dengan menghadkan aktiviti kontraksi (Maaliki et al., 2019).

Nitrik oksida (NO) memainkan peranan penting dalam pengawalaturan aktiviti kontraksi aorta. Aras optimum NO dapat dicapai sama ada dengan meningkatkan penghasilan mahupun dengan mengurangkan degradasi NO. Kekurangan bioavailibiliti NO menjadi penyumbang kepada patogenesis aterosklerosis aruhan diet berikutan pengambilan minyak yang dipanaskan berulang kali. Nitrik oksida adalah tidak stabil dan mudah terurai kepada nitrit. Dengan itu, aras NO plasma dalam kajian ini diukur secara tidak langsung dengan menentukan kandungan nitrit.

Kajian ini menunjukkan bahawa aras nitrik oksida yang diukur pada kumpulan pascamenopaus menurun berbanding kawalan. Penurunan aras nitrit plasma mungkin disebabkan oleh peningkatan degradasi NO oleh radikal bebas selain daripada

penyahaktifan NO berikutan ketidakseimbangan antara kandungan antioksidan dan oksidan. Penghasilan radikal bebas seperti anion superoksida bertindak balas dengan NO untuk membentuk peroksinitrit yang menyumbang kepada disfungsi endotelium serta meningkatkan aras tekanan darah dan risiko aterosklerosis (Chen et al. 2018).

Tikus yang diberi suplemen *Gynura procumbens* pada dos 250 mg/kg dan 500 mg/kg menunjukkan peningkatan aras nitrit plasma setelah tamat tempoh kajian selama 24 minggu. Hasil yang didapati adalah selari dengan kajian oleh Ning et al. (2019) yang membuktikan bahawa kemungkinan kehadiran polisakarida yang dikenal pasti dalam ekstrak *Gynura procumbens* memberi kesan peningkatan aras NO walaupun belum ada kajian terperinci dilakukan.

Pengambilan diet tinggi lemak dengan 5HPO mengaruh pembentukan radikal bebas dan produk hidroksil yang menyebabkan inflamasi serta meningkatkan ketidakaktifan NO. Keadaan ini menyumbang kepada ketakfungsian endotelium sekaligus meningkatkan tekanan darah (Touyz, 2004). Kajian semasa menunjukkan peningkatan aras penanda biologi inflamasi; IL-6, TNF- dan CRP kumpulan pascamenopaus seperti yang dilaporkan dalam kajian lain (Liu et al., 2010b). Peningkatan IL-6 yang dilihat pada lesi aterosklerosis manusia dan haiwan meningkatkan ekspresi CRP dalam sel otot licin arteri koronari manusia (Liu et al., 2010a).

Satu lagi kajian melaporkan bahawa pengambilan makanan yang kaya dengan lipid dikaitkan dengan peningkatan kadar leptin plasma dan adiposit, yang akhirnya menyebabkan penanda inflamasi seperti faktor nekrosis tumor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) dan interleukin-6 (IL-6) meningkat (Schaffler et al., 2007). Selari dengan dapatan kajian ini, Ludgero-Correia Jr et al. (2012) mendapati kumpulan tikus diovariectomi yang diberi diet tinggi lemak (OVX-HF) menunjukkan peningkatan aras IL-6 yang signifikan tetapi tidak dengan aras TNF- $\alpha$ . Kajian ini juga bersetuju dengan kajian lain yang menunjukkan bahawa aras protein TNF- $\alpha$  dan juga IL-6 meningkat dengan ketara pada kumpulan tikus OVX-HF (Rogers et al. 2009).

Molekul lekatan seperti VCAM-1 dan ICAM-1 juga diaruh oleh rangsangan ROS (Cook-Mills et al., 2011), sitokin inflamasi seperti TNF- $\alpha$  (Zhang et al., 2013) dan

oxLDL pada sel endotelium yang berkait dengan aktiviti inflamasi (Khan et al., 1995). Molekul lekatan ini sangat penting untuk mengaktifkan ketakfungsian endotelium yang meningkat pada tikus pascamenopaus. Peningkatan ekspresi VCAM-1 dan ICAM-1 menunjukkan berlakunya aruhan inflamasi akibat pengambilan diet tinggi lemak. Kajian Fotis et al. (2012) melaporkan bahawa peningkatan ICAM-1 berlaku pada tikus Wistar jantan yang diberi diet tinggi lemak selama 12 dan 16 minggu. Namun, ia tidak memberi kesan kepada ekspresi VCAM-1. Dapatan yang serupa juga dibuktikan oleh Lee et al. (2011) yang menunjukkan diet aterogenik meningkatkan aras ekspresi ICAM-1 dan VCAM-1 dalam aorta torasik serta E-selektin.

Dalam kajian semasa, suplemen ekstrak *Gynura procumbens* didapati menurunkan ekspresi sICAM-1 dan sVCAM-1 pada keadaan pascamenopaus. Ekspresi molekul ini menjelaskan berlakunya tindak balas terhadap rangsangan inflamasi yang meangaruh interaksi antara endotelium dan sel darah semasa perkembangan aterosklerotik pada peringkat awal (Fotis et al., 2012). Namun, komponen bioaktif flavonoid dalam *Gynura procumbens* memberikan kesan anti-inflamasi dengan menurunkan ekspresi VCAM-1, ICAM-1, E-selektin dan sitokin dengan menghalang perlekatan sel dan merencatkan ekspresi molekul (Hassan et al. 2010).

Kajian oleh Dwijayanti dan Rifa'i (2015) melaporkan aktiviti imunomodulator *Gynura procumbens* telah diuji menggunakan sel limpa tikus. Rawatan ekstrak daun etanolik *Gynura procumbens* pada 0.1 dan 1.0 µg / mL menyebabkan percambahan CD4 + CD25 +, CD4 + CD62L<sup>-</sup>, CD4 + CD62L +, CD8 + CD62L<sup>-</sup> dan CD8 + CD62L + T sel yang lebih tinggi tetapi percambahan B220+ lebih rendah sel jika dibandingkan dengan dos yang lebih tinggi pada kadar 10 µg/mL. Walau bagaimanapun, pada dos 10 µg/mL terbukti dapat merangsang percambahan sel B yang tinggi. Hasil ini menunjukkan bahawa kepekatan yang digunakan dalam eksperimen adalah faktor penentu sama ada *Gynura procumbens* bertindak sebagai imunostimulan atau imunosupresan (Tan et al. 2016).

Kajian sebelum ini mencadangkan steroid mungkin salah satu daripada kelas komponen anti-inflamasi yang menekan respon inflamasi (Jarikasem et al., 2013)

dengan menghalang vasodilatasi dan meningkatkan kebolehtelapan salur darah yang berlaku berikutan aktiviti inflamasi (Timotius and Rahayu, 2020).

Oleh itu, kajian metabolit juga dilakukan untuk mengenal pasti perubahan profil metabolit tidak disasarkan dan tapak jalan yang terlibat dengan kesan ateroprotektif ini. Perubahan pada profil metabolit ini menyebabkan beberapa tapak jalan biokimia telah terkesan. Tapak jalan tersebut melibatkan metabolisme glutation, asid arakidonik (eikosanoid), arginina dan prolina, gliserofosfolipid dan alanina, aspartat dan glutamat. Secara keseluruhannya, tapak jalan biokimia yang terkesan pada tikus yang diberi diet tinggi lemak dan suplementasi ekstrak *Gynura procumbens* tertumpu kepada dua peranan utama iaitu melibatkan sistem antioksidan dan penghasilan tenaga. Beberapa tapak jalan biokimia lain juga dilihat terkesan dengan status oksidatif yang tinggi akibat pengambilan diet tinggi lemak diikuti dengan pemberian suplementasi ekstrak *Gynura procumbens*. Namun, perbincangan kajian ini memfokuskan kepada perubahan pada tapak jalan metabolisme glutation dan eicosanoid kerana metabolit yang terkesan pada tapak jalan ini adalah relevan dan mempunyai kaitan klinikal yang terlibat dalam patogenesis aterosklerosis (Wang et al., 2021).

Perubahan pada tapak jalan biokimia yang melibatkan sistem antioksidan adalah metabolisme glutation yang diwakili oleh beberapa metabolit seperti GSH, GSSG, 5-Oksoprolina dan asid L-glutamik. Kajian semasa menunjukkan penurunan lipatan FC oleh metabolit GSH dan GSSG iaitu masing-masing sebanyak 4.4 dan 1.3 kali ganda dalam kumpulan pascamenopaus (PM vs kawalan). 5-Oksoprolina pula menunjukkan kenaikan perubahan lipatan yang tinggi (7.9 kali ganda) manakala asid-L-glutamik atau L-glutamat menunjukkan pertambahan lipatan (FC) sebanyak 3.81 kali ganda dalam perbandingan kumpulan PM vs kawalan.

Glutation merupakan molekul tripeptida yang penting dalam sistem antioksidatif sel dan tisu (Gaucher et al. 2018). Tekanan oksidatif tinggi disebabkan pengambilan diet tinggi lemak mengakibatkan pertambahan aras spesies oksigen reaktif (ROS) seperti hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Incalza et al. 2018). Molekul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dineutralkan oleh tindak balas dengan glutation terturun (Cabezas et al. 2018) untuk membentuk H<sub>2</sub>O serta glutation teroksidasi (GSSG) iaitu mangkinan enzim glutation

peroksidase (Kwiecien et al. 2014). Enzim glutathion reduktase pula menurunkan kembali GSSG kepada GSH untuk kitaran antioksidan yang berikutnya seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 5.1 (Sato et al. 2011).

Biosintesis glutathion bermula melalui tindak balas asid amino glutamat atau asid glutamik dan sisteina dengan kehadiran pemangkin glutamilsisteina sintetase untuk menghasilkan  $\gamma$ -glutamilsisteina ( $\gamma$ -GC). Seterusnya, reaksi antara  $\gamma$ -GC dengan glisina membentuk  $\gamma$ -glutamilsisteinilglisina atau GSH pula dimungkinkan oleh enzim glutathion sintetase (Rajah 5.2). Kedua-dua proses ini menggunakan dua molekul adenosina trifosfat (ATP) sebagai pembekal tenaga dalam tindak balas biokimia tersebut (Wu et al. 2004). Dalam keadaan normal, aras GSH yang tinggi dalam sel berfungsi sebagai perencat suap-balik terhadap enzim glutamilsisteina sintetase dan memperlahankan aktiviti (Toroser & Sohal 2005). Namun begitu, akibat pengambilan diet tinggi lemak oleh tikus menopause, berlaku peningkatan tekanan oksidatif disamping penurunan aras GSH akibat pertukaran daripada GSH kepada GSSG (Zhu et al. 2020).

Penurunan ini mengganggu mekanisme rencatan suap-balik yang dikawal oleh GSH, lalu aktiviti enzim glutamilsisteina sintetase diaktifkan serta meningkatkan penghasilan perantara  $\gamma$ -GC (Ristoff et al. 2002). Molekul  $\gamma$ -GC ini boleh dimetabolismekan kepada 5-Oksoprolina oleh  $\gamma$ -glutamil siklotransferase. Akhirnya, enzim 5-Oksoprolinase menukarkan 5-Oksoprolina kembali kepada glutamat yang merupakan molekul awalan dalam biosintesis glutathion untuk dikitar semula kepada GSH (Duewall et al. 2010). Enzim 5-Oksoprolinase adalah enzim berkapasiti rendah (Pena & Brandon 2017). Oleh yang demikian, apabila aras GSH berkurangan, kepekatan 5-Oksoprolina dalam tisu meningkat secara tidak langsung akibat proses tapak jalan biosintesis glutathion.

Dapatan kajian terdahulu menunjukkan, peningkatan FC 5-Oksoprolina pada tisu aorta tikus hiperkolesterolemia secara langsung turut menyebabkan meningkatnya aras molekul tersebut di dalam serum (Méndez et al. 2014). Dapatan-dapatan yang telah dinyatakan ini, mencadangkan bahawa peningkatan 5-Oksoprolina pada tikus yang diberi diet tinggi lemak adalah satu penanda penting kepada penurunan aras glutathion.

Pemberian ekstrak *Gynura procumbens* meningkatkan ekspresi metabolit GSH dan GSSG masing-masing sebanyak 7.3 dan 6.9 kali ganda (PM+250GP vs PM) dan 7.1 dan 1.2 kali ganda (PM+500GP vs PM). Kenaikan lipatan FC GSH dan GSSG juga dilihat dengan rawatan statin (3.6 dan 1.3 kali ganda). Bagi metabolit 5-Oksoprolina, ia tidak diekspreskan dengan suplemen ekstrak *Gynura procumbens* mahupun statin. Begitu juga dengan metabolit glutamat yang tidak terkesan dengan suplemen ekstrak *Gynura procumbens* pada 500 mg/kg (PM+500GP vs PM), tetapi menunjukkan kenaikan lipatan FC dengan 250 mg/kg ekstrak *Gynura procumbens* (PM+250GP vs PM) dan PM+ATV vs PM iaitu masing-masing sebanyak 4.2 dan 3.2 kali ganda. Melalui dapatan ini, kemungkinan aras glutation yang tinggi dalam tisu aorta yang mendapat suplemen ekstrak *Gynura procumbens* merencatkan aktiviti enzim glutamilsisteina sintetase dan menurunkan aras  $\gamma$ -GC tetapi tidak mengubah metabolitnya iaitu 5-Oksoprolina.

Glutation teroksidasi dan GSH adalah penanda aras kepada ketidakseimbangan redoks yang berhubung kait dengan tekanan oksidatif yang mana ditunjukkan melalui nisbah GSH kepada GSSG (Tsuru et al. 2006). Eksperimen terdahulu terhadap tikus yang diberikan etanol menggunakan gavaj intragastrik selama 30 hari menunjukkan gangguan pada status redoks hati glutation yang menyebabkan penurunan drastik aras GSH dan peningkatan GSSG. Namun, rawatan dengan kuersertin meningkatkan aktiviti enzim CAT dan SOD yang aktivitiya dipertahankan pada aras normal kesan daripada aktiviti kedua-dua metabolit tersebut pada glutation. Peningkatan aras GSH mungkin disebabkan oleh kuersertin yang bertindak sebagai antioksidan yang berpotensi. Selain itu, kuersertin juga berkemungkinan merangsang pengeluaran GSH dari GSSG dengan mengaruh enzim GR dan seterusnya mendorong peningkatan aktiviti peroksidase (Molina et al. 2003). Hasil ini menunjukkan bahawa nisbah GSH kepada GSSG bertanggungjawab untuk mengekalkan status oksidatif melalui tindak balas rantai yang berlaku pada membran lipid (Forman et al. 2009).

Kandungan antioksidan polifenol yang tinggi dalam ekstrak *Gynura procumbens* mungkin merupakan faktor utama yang bertanggungjawab terhadap kesan ini. Walau bagaimanapun, kajian lebih lanjut diperlukan sebelum antioksidan ini dapat

digunakan dengan selamat sebagai rawatan alternatif terhadap risiko penyakit berkaitan kardiovaskular termasuk aterosklerosis.

Perubahan laluan kimia yang terlibat dalam penghasilan tenaga adalah metabolisme asid arakidonik (eikosanoid) yang diwakili oleh metabolit 20-HETE, 2-metoksiestradiol (2-ME) dan lipoksin-A5 (LXA5). Dalam kajian semasa, metabolit 20-HETE didapati menunjukkan peningkatan pengekspresan sebanyak 7.18 kali ganda pada kumpulan kawalan berbanding pascamenopaus. Metabolit 2-ME dan LXA5 pula menunjukkan kenaikan perubahan lipatan masing-masing sebanyak 3.4 dan 5.28 kali ganda dalam perbandingan kumpulan PM vs kawalan.

Metabolisme asid arakidonik menyediakan tapak jalan untuk penjaanaan pelbagai isyarat molekul seperti sistolik fosfolipase A2 yang membebaskan asid arakidonat dari kumpulan fosfolipid dalam membran sel (Saito et al. 2012). Ia adalah asid lemak poliatkentu yang dijumpai dalam fosfolipid terutamanya fosfatidiletanolamina, fosfatidilkolin dan fosfatidilinositida dalam membran sel serta banyak terdapat di otak, otot dan hati (Korotkova & Lundberg 2014). Asid arakidonik juga merupakan isyarat kimia yang dikeluarkan oleh otot untuk mengawal tindak balas fisiologi utama semasa bersenam dan mengatur intensiti semua isyarat pertumbuhan (Tallima & El Ridi 2018). Semasa mengalami kecederaan tisu, keradangan terlibat dalam penyembuhan luka pada otot.

Metabolit 20-HETE merupakan eikosanoid yang mewakili metabolisme asid arakidonik terbitan daripada sitokrom P4504A yang dihasilkan secara endogenus oleh sel otot licin vaskular (VSMC) (Imig et al. 1996). 20-HETE adalah metabolit asid arakidonat yang menunjukkan pelbagai kesan biologi dalam sistem vaskular berkaitan dengan kereaktifan, pengaktifan, pembentukan semula vaskular serta peranannya dalam inflamasi vaskular dan angiogenesis (Hoopes et al. 2015). 20-HETE telah dicirikan secara ekstensif sebagai vasokonstriktor berpotensi yang bertindak untuk menghalang aktiviti saluran K<sup>+</sup> pada VSMC (Kume 2018). Selain itu, 20-HETE juga dilaporkan meningkatkan inflamasi dan kecederaan vaskular pada model tikus diabetes, iskemia atau reperfusi serta tekanan oksidatif serebrovaskular.

Pada kajian lepas, 20-HETE didapati berperanan dalam inflamasi dan kecederaan vaskular. Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, 20-HETE mendorong pengaktifan endotelium melalui peningkatan peraturan molekul lekatan dan ekspresi sitokin pro-inflamasi. Seiring dengan ekspresi sitokin pro-inflamasi, 20-HETE juga mempengaruhi aspek lain keradangan dan kecederaan vaskular dalam keadaan patologi. Peranan 20-HETE dalam inflamasi vaskular telah ditunjukkan pada model iskemia / reperfusi. Dalam model kecederaan iskemia/reperfusi buah pinggang, rawatan dengan perencat CYP4A / F-HET0016 atau antagonis 20-HETE 6,15,20-HEDE menunjukkan kesan pelindung dengan mengurangkan keradangan vaskular, kecederaan pada tubular dan kehilangan fungsi ginjal (Hoff et al. 2011).

Kajian lain pula melaporkan bahawa aorta dari tikus yang dirawat dengan 20-HETE meningkatkan pengaktifan ERK1 / 2 dan gangguan pengaktifan insulin yang bergantung pada tapak jalan IRS-1 / PI3K / Akt / eNOS yang mengawal kesan vasodilator insulin (Li et al. 2014). Selari dengan dapatan ini, beberapa kajian lepas telah menetapkan peranan 20-HETE dalam nefropati diabetes (Eid et al. 2013b) namun, mekanisme khusus yang melibatkan 20-HETE dan pengaruhnya terhadap sistem vaskular yang membawa kepada perkembangan penyakit ini masih tidak difahami sepenuhnya. Dalam model tikus diabetes yang disebabkan oleh streptozotocin, hipertrofi buah pinggang dikaitkan dengan peningkatan ekspresi CYP4A dan pengeluaran 20-HETE, peningkatan ekspresi fibronektin dan TGF-1 serta peningkatan aktiviti oksidase ROS dan NADPH (Eid et al. 2013a). Gangadhariah et al. (2014) merawat tikus jantan dengan gangguan genetik Cyp4a14 dengan streptozotocin untuk mengaruh diabetes. Kajian ini menentukan bahawa hipertensi yang disebabkan oleh 20-HETE adalah penyumbang utama kepada perkembangan penyakit buah pinggang dan diabetes (Gangadhariah et al. 2015).

Lipoksins (LX) atau produk interaksi lipoksigenase dihasilkan dari asid arakidonik melalui tindakan berurutan lipoksigenase dan tindak balas penghasilan eikosanoid yang mengandungi trihidroksitetraene. Struktur unik trihidroksitetraen terbentuk semasa interaksi sel-sel dan bertindak pada kedua-dua tempat yang temporal dan ruang dari eikosanoid lain yang dihasilkan semasa tindak balas inflamasi (Ismael 2015). Lipoksin A4 (LXA4) dan lipoksin B4 (LXB4) adalah isomer kedudukan yang

masing-masing mempunyai tindak balas sel dan in vivo yang baik. Struktur LX ini dipelihara di seluruh spesies. Hasil daripada kajian lepas mengesahkan bahawa LXA4 dan LXB4 adalah pengantara kimia eikosanoid yang terawal menunjukkan tindakan anti-inflamasi dalam model penyakit yang menggunakan haiwan seperti arnab, tikus dan tikus. LX bertindak pada reseptor berpasangan protein G (GPCR) tertentu sebagai agonis untuk mengatur tindak balas sel yang terlibat dengan aktiviti keradangan (Harizi et al. 2008).

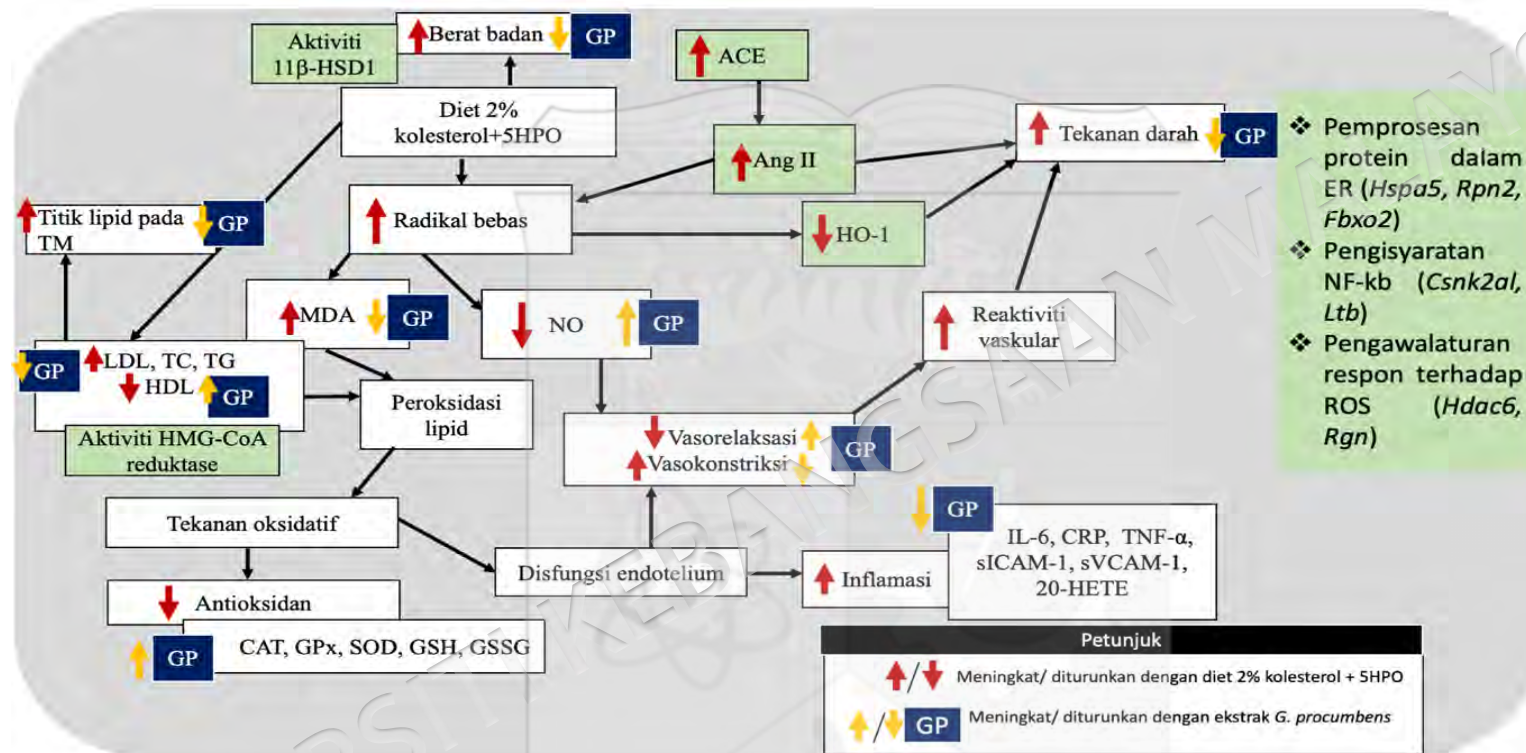
Kajian terdahulu telah membuktikan bahawa 2-methoxyestradiol (2-ME) adalah metabolit biologi aktif yang terlibat dalam sistem kardiovaskular terutamanya reseptor estrogen (Maayah et al. 2018). 2-ME telah terbukti melindungi jantung dan saluran darah dari proses patologi, terutamanya yang melibatkan sel-sel otot licin vaskular serta migrasi dan percambahan fibroblas jantung (Barchiesi et al. 2002). 2-ME juga dikenali sebagai sitokrom P450 1B1 (CYP1B1) utama yang bertindak sebagai vasoprotektif dan anti-inflamasi (Wright 2014). Perlindungan CYP1B1 terhadap hipertensi yang diaruh oleh Ang II dan patogenesis yang berkaitan pada tikus betina dimodulasikan oleh metabolit 2-ME yang dihasilkan oleh CYP1B1-estradiol (E2). Pemerhatian ini mencadangkan kemungkinan bahawa metabolit 2-ME dapat menjadi pelindung hipertensi yang disebabkan oleh Ang II dengan menghalang ekspresi pengeluaran CYP4A1 dan 20-HETE (Song et al. 2019).

Pemberian ekstrak *Gynura procumbens* (PM+250GP vs PM) pada dos 250 mg/kg menurunkan ekspresi metabolit 20-HETE sebanyak 4.5 kali ganda, dengan dos 500 mg/kg juga sebanyak 3.6 kali ganda. Namun, 20-HETE tidak diekspreskan dalam kumpulan tikus yang menerima rawatan statin. Perubahan juga dilihat pada metabolit 2-ME dan LXA5 kumpulan PM+250GP vs PM dan PM+500GP vs PM yang diberi suplemen ekstrak *Gynura procumbens*. Masing-masing menunjukkan penurunan sebanyak 1.9 dan 2.84 serta 2.3 dan 4.8 kali ganda. Namun, kedua-dua metabolit ini tidak terekspres apabila menerima rawatan statin.

Metabolit asid arakidonik memainkan peranan penting dalam pengawalan tekanan darah. Kajian lepas menunjukkan potensi penurunan tekanan darah pada tikus hipertensi spontan (SHR) oleh kuersertin iaitu salah satu komponen aktif yang dikenal

pasti dalam ekstrak *Gynura procumbens*. Kajian ini menunjukkan bahawa peningkatan pengeluaran 20-HETE mempunyai kesan pro-hipertensi, melalui kesan vasokonstriktifnya yang kuat pada arteriol aferen ginjal dan menggalakkan penghambatan natrium pada ginjal SHR yang menyebabkan peningkatan tekanan darah secara mendadak (Elbarbry et al. 2020).

Dalam kajian eksperimen terbaru, metabolit 2-metoksiestradiol (2-ME) didapati memperbaiki keadaan obesiti aruhan diet tinggi lemak (HFD) dan memulihkan kepekaan insulin pada tikus (Hamza et al. 2020). Dapatan kajian tersebut mendapati rawatan dengan 2-ME dikaitkan dengan pengurangan penyusupan makrofaj yang signifikan di tisu adipos, pergeseran polarisasi makrofaj seperti yang ditunjukkan oleh penurunan yang signifikan dalam ekspresi penanda pro-inflamasi (IL-6, IL-1 $\beta$ , CD11c dan iNOS) serta peningkatan ketara pada penanda makrofaj anti-radang (Arginase 1 dan IL-10). Metabolit 2-ME memperbaiki keadaan obesiti dan ketidaktoleransi glukosa yang disebabkan oleh HFD melalui penghambatan penyusupan makrofaj tisu adipos. Cadangan mekanisme ateroprotektif oleh ekstrak *Gynura procumbens* ditunjukkan seperti dalam Rajah 5.1.



Rajah 5.1 Cadangan mekanisme ateroprotektif *Gynura procumbens* yang ditunjukkan dalam kajian ini

Nota: Kotak berwarna hijau adalah cadangan bagi kajian lanjutan

## BAB VI

### KESIMPULAN

#### 6.1 KESIMPULAN KAJIAN

Ekstrak *Gynura procumbens* mengandung sebatian kaempferol, quercetin dan asid klororogenik yang menunjukkan kesan ateroprotektif ke atas tikus menopause diberi diet tinggi lemak yang dicampur dengan minyak sawit yang dipanaskan berulang kali (5HPO). Kesan ateroprotektif *Gynura procumbens* ditunjukkan melalui aktiviti antioksidan dan anti-inflamasi. Aktiviti antioksidannya ditunjukkan dengan meningkatkan aktiviti enzim antioksidan (CAT, GPx dan SOD) dan menurunkan oksidan tikus menopause yang diberi diet tinggi lemak. Tindakan enzim antioksidan adalah dengan menyahaktifkan ROS dan seterusnya menghalang oksidasi LDL. Tindakan ini mengurangkan pengumpulan lemak di tunika media aorta serta mengekalkan fungsi organ. Aras LDL, kolesterol total dan triasilgliserol total juga menurun dan aras HDL meningkat membantu dalam membawa lemak ke hepar. Kehadiran GSH pada tikus yang diberi *Gynura procumbens* mengoptimumkan metabolisme glutation dengan mengekalkan glutation dalam bentuk terturun untuk mengawal tekanan oksidatif yang ditunjukkan pada penurunan MDA. Pengurangan pengumpulan lemak yang berlaku disebabkan oleh kesan *Gynura procumbens* membantu memperbaiki tekanan darah sistolik dengan meningkatkan aras nitrik oksida untuk membaiki fungsi endotelium dan mengekalkan reaktiviti vaskular. Kesan anti-inflamasi yang ditunjukkan oleh *Gynura procumbens* melibatkan metabolisme eikosanoid. Perencatan pada tapak jalan sitokrom P450 ditunjukkan dengan pengurangan 20-HETE, sICAM-1, sVCAM-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 dan CRP untuk membaiki disfungsi endotelium yang disebabkan inflamasi.

Mekanisme ateroprotektif oleh ekstrak *Gynura procumbens* boleh diperincikan lagi dengan melakukan beberapa kajian lanjutan seperti:

1. Mengukur enzim pengawalan tekanan darah seperti penukar angiotensin (ACE), angiotensin II (Ang II) dan hem oksigenase-1 (HO-1) dalam plasma yang mewakili enzim di sistem periferi untuk proses validasi mekanisme peningkatan tekanan darah dalam tikus menopause.
2. Mengukur pengekspresan gen yang terlibat dalam proses pengawalan respon terhadap ROS (gen Hdac6 dan Rgn), tapak jalan pemprosesan protein dalam retikulum endoplasmik (gen Hspa5, Rpn2 dan Fbxo2) dan pengisyratan NF- $\kappa$ B (gen Csn2a1 dan Ltb).
3. Mengukur aktiviti enzim HMG-CoA reduktase yang mungkin direncatkan oleh ekstrak *Gynura procumbens* yang meyerupai agen statin di dalam memperbaiki profil lipid dalam tikus menopause.
4. Mengukur aktiviti enzim 11 $\beta$ -HSD1 di dalam tisu hepar dan tisu adipos kerana berat tisu adipos visceral adalah lebih bersesuaian berbanding berat badan keseluruhan memandangkan pengukuran enzim 11 $\beta$ -HSD1 adalah lebih spesifik dari tisu adipos visceral.
5. Melakukan proses validasi bagi metabolit-metabolit yang didapati berubah dalam kajian ini dengan dengan menjalankan analisis metabolomik dengan LC-MS menggunakan sampel baharu.
6. Menjalankan kajian berasaskan genomik, transkriptomik dan proteomik bagi mengenalpasti bagaimana ekstrak *Gynura procumbens* mengawalatur isyarat dalam sel yang menyebabkan perubahan pada profil metabolik.

## RUJUKAN

- A Akowuah, G., Ahmad, M. & M Fei, Y. 2012. Effects of *Gynura procumbens* Leaf Extracts on Plasma Lipid Peroxidation and Total Antioxidant Status in Ccl4-Treated Rats. *The Natural Products Journal* 2(4): 247-251.
- Abd El, H. a. H. M. 2012. Lipid Peroxidation End-Products as a Key of Oxidative Stress: Effect of Antioxidant on Their Production and Transfer of Free Radicals. Dlm. (pnyt.). *Lipid Peroxidation*, hlm.: IntechOpen.
- Adam, S. K., Das, S. & Jaarin, K. 2009. A Detailed Microscopic Study of the Changes in the Aorta of Experimental Model of Postmenopausal Rats Fed with Repeatedly Heated Palm Oil. *International journal of experimental pathology* 90(3): 321-327.
- Adam, S. K., Soelaiman, I. N., Umar, N. A., Mokhtar, N., Mohamed, N. & Jaarin, K. 2008. Effects of Repeatedly Heated Palm Oil on Serum Lipid Profile, Lipid Peroxidation and Homocysteine Levels in a Post-Menopausal Rat Model. *McGill Journal of Medicine: MJM* 11(2): 145.
- Adam, S. K., Sulaiman, N. A., Top, A. M. & Jaarin, K. 2007. Heating Reduces Vitamin E Content in Palm and Soy Oils. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 15(2): 76-79.
- Algariri, K., Atangwho, I. J., Meng, K. Y., Asmawi, M. Z., Sadikun, A. & Murugaiyah, V. 2014. Antihyperglycaemic and Toxicological Evaluations of Extract and Fractions of *Gynura procumbens* Leaves. *Tropical life sciences research* 25(1): 75.
- Ali, I. & Wojnarowska, F. 2011. Physiological Changes in Scalp, Facial and Body Hair after the Menopause: A Cross-Sectional Population-Based Study of Subjective Changes. *British Journal of Dermatology* 164(3): 508-513.
- Allender, S., Scarborough, P., Peto, V., Rayner, M., Leal, J., Luengo-Fernandez, R. & Gray, A. 2008. European Cardiovascular Disease Statistics. *European Heart Network* 3(11-35).
- Anagnostis, P., Theocharis, P., Lallas, K., Konstantis, G., Mastrogiannis, K., Bosdou, J. K., Lambrinouadaki, I., Stevenson, J. C. & Goulis, D. G. 2020. Early Menopause Is Associated with Increased Risk of Arterial Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis.
- Aniza, I., Nurmawati, A., Hanizah, Y. & Ahmad Taufik, J. 2016. Modifiable Risk Factors of Cardiovascular Disease among Adults in Rural Community of Malaysia: A Cross Sectional Study. *Malaysian Journal of Public Health Medicine* 16(1): 53-61.

- Ashraf, K. 2019. An Updated Phytochemical and Pharmacological Review on *Gynura procumbens*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 12(9-14).
- Assmann, G., Cullen, P., Evers, T., Petzinna, D. & Schulte, H. 2005. Importance of Arterial Pulse Pressure as a Predictor of Coronary Heart Disease Risk in Proc. *European heart journal* 26(20): 2120-2126.
- Azimah, A., Azrina, A., Norhaizan, M., Sokhini, M. A. & Daud, A. 2013. Industrially Produced Trans Fatty Acids: Major Potential Sources in Malaysian Diet. *International Food Research Journal* 20(3): 1157.
- Azman, A., Shahrul, S. M., Chan, S., Noorhazliza, A., Khairunnisak, M., Azlina, M., Qodriyah, H., Kamisah, Y. & Jaarin, K. 2012. Level of Knowledge, Attitude and Practice of Night Market Food Outlet Operators in Kuala Lumpur Regarding the Usage of Repeatedly Heated Cooking Oil. *Medical Journal of Malaysia* 67(1): 91-101.
- Badeau, M., Adlercreutz, H., Kaihovaara, P. & Tikkanen, M. J. 2005. Estrogen a-Ring Structure and Antioxidative Effect on Lipoproteins. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 96(3-4): 271-278.
- Badimon, L. & Vilahur, G. 2014. Thrombosis Formation on Atherosclerotic Lesions and Plaque Rupture. *Journal of internal medicine* 276(6): 618-632.
- Baharuddin, D. N. 2017. Comparison of Dry Eyes Parameters in Postmenopausal Women with and without Honey Supplement. Tesis UNIVERSITI SAINS MALAYSIA.
- Bailey, R. L., Zou, P., Wallace, T. C., McCabe, G. P., Craig, B. A., Jun, S., Cauley, J. A. & Weaver, C. M. 2020. Calcium Supplement Use Is Associated with Less Bone Mineral Density Loss, but Does Not Lessen the Risk of Bone Fracture across the Menopause Transition: Data from the Study of Women's Health across the Nation. *JBMR plus* 4(1): e10246.
- Baker, L., Meldrum, K. K., Wang, M., Sankula, R., Vanam, R., Raiesdana, A., Tsai, B., Hile, K., Brown, J. W. & Meldrum, D. R. 2003. The Role of Estrogen in Cardiovascular Disease. *Journal of surgical research* 115(2): 325-344.
- Balakumar, P. & Kaur, J. 2009. Is Nicotine a Key Player or Spectator in the Induction and Progression of Cardiovascular Disorders? *Pharmacological research* 60(5): 361-368.
- Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C., Bennett, M. R. & Mallat, Z. 2019. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Nature reviews cardiology* 1-18.
- Belkova, B., Hradecky, J., Hurkova, K., Forstova, V., Vaclavik, L. & Hajslova, J. 2018. Impact of Vacuum Frying on Quality of Potato Crisps and Frying Oil. *Food chemistry* 241(51-59).

- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R. & Falk, E. 2014. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circulation research* 114(12): 1852-1866.
- Bhattacharya, A. B., Sajilata, M. & Singhal, R. S. 2008. Lipid Profile of Foods Fried in Thermally Polymerized Palm Oil. *Food chemistry* 109(4): 808-812.
- Borén, J., Chapman, M. J., Krauss, R. M., Packard, C. J., Bentzon, J. F., Binder, C. J., Daemen, M. J., Demer, L. L., Hegele, R. A. & Nicholls, S. J. 2020. Low-Density Lipoproteins Cause Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Pathophysiological, Genetic, and Therapeutic Insights: A Consensus Statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European heart journal*.
- Bouchi, R., Ohara, N., Asakawa, M., Nakano, Y., Takeuchi, T., Murakami, M., Sasahara, Y., Numasawa, M., Minami, I. & Izumiyama, H. 2016. Is Visceral Adiposity a Modifier for the Impact of Blood Pressure on Arterial Stiffness and Albuminuria in Patients with Type 2 Diabetes? *Cardiovascular diabetology* 15(1): 10.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. & Krause, K.-H. 2012. Reactive Oxygen Species: From Health to Disease. *Swiss medical weekly* 142(w13659).
- Brindle, J. T., Nicholson, J. K., Schofield, P. M., Grainger, D. J. & Holmes, E. 2003. Application of Chemometrics to <sup>1</sup>H Nmr Spectroscopic Data to Investigate a Relationship between Human Serum Metabolic Profiles and Hypertension. *Analyst* 128(1): 32-36.
- Cabrera-Rego, J. O., Navarro-Despaigne, D., Staroushik-Morel, L., Díaz-Reyes, K., Lima-Martínez, M. M. & Iacobellis, G. 2018. Association between Endothelial Dysfunction, Epicardial Fat and Subclinical Atherosclerosis During Menopause. *Clínica e investigación en arteriosclerosis* 30(1): 21-27.
- Cai, H. Q., Catts, V. S., Webster, M. J., Galletly, C., Liu, D., O'donnell, M., Weickert, T. W. & Weickert, C. S. 2018. Increased Macrophages and Changed Brain Endothelial Cell Gene Expression in the Frontal Cortex of People with Schizophrenia Displaying Inflammation. *Molecular psychiatry* 1-15.
- Chan, Y. Y., Lim, K. K., Lim, K. H., Teh, C. H., Kee, C. C., Cheong, S. M., Khoo, Y. Y., Baharudin, A., Ling, M. Y. & Omar, M. A. 2017. Physical Activity and Overweight/Obesity among Malaysian Adults: Findings from the 2015 National Health and Morbidity Survey (Nhms). *BMC Public Health* 17(1): 733.
- Chen, L., Jiang, Z., Akakuru, O., Yang, L., Li, J., Ma, S. & Wu, A. 2020. Recent Progress in the Detection and Treatment of Atherosclerosis by Nanoparticles. *Materials Today Chemistry* 17(100280).
- Choe, E. & Min, D. 2007. Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. *Journal of food science* 72(5): R77-R86.
- Choe, E. & Min, D. B. 2006. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 5(4): 169-186.

- Choi, S.-I., Lee, H.-A. & Han, J.-S. 2016. *Gynura procumbens* Extract Improves Insulin Sensitivity and Suppresses Hepatic Gluconeogenesis in C57bl/Ksj-Db/Db Mice. *Nutrition research and practice* 10(5): 507-515.
- Chong, C., Othman, F. & Hussan, F. 2018. Vascular Protective Effects of Morinda Citrifolia Leaf Extract on Postmenopausal Rats Fed with Thermoxidized Palm Oil Diet: Evidence at Microscopic Level. *International journal of vascular medicine* 2018.
- Chu, Y., Lan, R. S., Huang, R., Feng, H., Kumar, R., Dayal, S., Chan, K. S. & Dai, D. F. 2020. Glutathione Peroxidase-1 Overexpression Reduces Oxidative Stress, and Improves Pathology and Proteome Remodeling in the Kidneys of Old Mice. *Aging Cell*
- Daugherty, A., Tall, A. R., Daemen, M. J., Falk, E., Fisher, E. A., García-Cardeña, G., Lusis, A. J., Owens Iii, A. P., Rosenfeld, M. E. & Virmani, R. 2017. Recommendation on Design, Execution, and Reporting of Animal Atherosclerosis Studies: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37(9): e131-e157.
- Davies, M. J. 2016. Protein Oxidation and Peroxidation. *Biochemical Journal* 473(7): 805-825.
- De Oliveira, M. R., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M. & Jardim, F. R. 2017. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Mitochondria, Back to the Future. *Trends in food science & technology* 67(76-92).
- Del Pinto, R. & Ferri, C. 2018. Inflammation-Accelerated Senescence and the Cardiovascular System: Mechanisms and Perspectives. *International journal of molecular sciences* 19(12): 3701.=
- Deroo, B. J. & Korach, K. S. 2006. Estrogen Receptors and Human Disease. *The Journal of clinical investigation* 116(3): 561-570.
- Detection, N. C. E. P. E. P. O. & Adults, T. O. H. B. C. I. 2002. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (Ncep) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel Iii)*. National Cholesterol Education Program, National Heart, Lung, and Blood.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P. & Victor, V. M. 2016. Role of Ros and Rns Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016.
- Du, F., Virtue, A., Wang, H. & Yang, X.-F. 2013. Metabolomic Analyses for Atherosclerosis, Diabetes, and Obesity. *Biomarker research* 1(1): 17.

- El Khoudary, S. R., Wang, L., Brooks, M. M., Thurston, R. C., Derby, C. A. & Matthews, K. A. 2016. Increase Hdl-C Level over the Menopausal Transition Is Associated with Greater Atherosclerotic Progression. *Journal of clinical lipidology* 10(4): 962-969.
- Faggiano, P., Dasseni, N., Gaibazzi, N., Rossi, A., Henein, M. & Pressman, G. 2019. Cardiac Calcification as a Marker of Subclinical Atherosclerosis and Predictor of Cardiovascular Events: A Review of the Evidence. *European journal of preventive cardiology* 26(11): 1191-1204.
- Falade, A. O., Oboh, G. & Okoh, A. I. 2017. Potential Health Implications of the Consumption of Thermally-Oxidized Cooking Oils—a Review. *Polish journal of food and nutrition sciences* 67(2): 95-106.
- Faria, A. & Persaud, S. J. 2017. Cardiac Oxidative Stress in Diabetes: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Pharmacology & therapeutics* 172(50-62).
- Florido, R., Zhao, D., Ndumele, C. E., Lutsey, P. L., Mcevoy, J. W., Windham, B. G., Pankow, J. S., Guallar, E. & Michos, E. D. 2016. Physical Activity, Parental History of Premature Coronary Heart Disease, and Incident Atherosclerotic Cardiovascular Disease in the Atherosclerosis Risk in Communities (Aric) Study. *Journal of the American Heart Association* 5(9): e003505.
- Fu, H., Teng, L., Bai, R., Deng, C., Lv, G. & Chen, J. 2017. Application of Acellular Intima from Porcine Thoracic Aorta in Full-Thickness Skin Wound Healing in a Rat Model. *Materials Science and Engineering: C* 71(1135-1144).
- Ghobadi, S., Akhlaghi, M., Shams, S. & Mazloomi, S. M. 2018. Acid and Peroxide Values and Total Polar Compounds of Frying Oils in Fast Food Restaurants of Shiraz, Southern Iran. *International Journal of Nutrition Sciences* 3(1): 25-30.
- Gill, C., Vatcheva, K. P., Pan, J.-J., Smulevitz, B., Mcpherson, D. D., Fallon, M., McCormick, J. B., Fisher-Hoch, S. P. & Laing, S. T. 2017. Frequency of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Subclinical Atherosclerosis among Young Mexican Americans. *The American journal of cardiology* 119(11): 1717-1722.
- Gimbrone Jr, M. A. & García-Cardena, G. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research* 118(4): 620-636.
- Glennon-Alty, L., Hackett, A. P., Chapman, E. A. & Wright, H. L. 2018. Neutrophils and Redox Stress in the Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Free Radical Biology and Medicine* 125(25-35).
- Gordon, J. L., Peltier, A., Grummisch, J. A. & Sykes Tottenham, L. 2019. Estradiol Fluctuation, Sensitivity to Stress, and Depressive Symptoms in the Menopause Transition: A Pilot Study. *Frontiers in psychology* 10(1319).

- Hakim, P., Sani, H. & Noor, M. 2016. Effects of *Gynura procumbens* on Sperm Quality and Testosterone Level in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(22-30).
- Hamsi, M. A., Othman, F., Das, S., Kamisah, Y., Thent, Z. C., Qodriyah, H. M. S., Zakaria, Z., Emran, A., Subermaniam, K. & Jaarin, K. 2015. Effect of Consumption of Fresh and Heated Virgin Coconut Oil on the Blood Pressure and Inflammatory Biomarkers: An Experimental Study in Sprague Dawley Rats. *Alexandria Journal of Medicine* 51(1): 53-63.
- Hassan, I. I., Muhammad, I. N., Ismail, S. B., Kadir, A. A., Noor, N. M. & Nik Hussain, N. H. 2017. Effect of Health Education Program on Cardiovascular Risk Factors among Menopausal Women in Malaysia. *International Medical Journal* 24(1): 51-55.
- Hassan, Z., Yam, M. F., Ahmad, M. & Yusof, A. P. M. 2010. Antidiabetic Properties and Mechanism of Action of *Gynura procumbens* Water Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Molecules* 15(12): 9008-9023.
- Hew, C.-S., Khoo, B.-Y. & Gam, L.-H. 2013. The Anti-Cancer Property of Proteins Extracted from *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. *PloS one* 8(7): e68524.
- Hoe, S.-Z., Lee, C.-N., Mok, S.-L., Kamaruddin, M. Y. & Lam, S.-K. 2011. *Gynura procumbens* Merr. Decreases Blood Pressure in Rats by Vasodilatation Via Inhibition of Calcium Channels. *Clinics* 66(1): 143-150.
- Hsieh, H.-S. & Zepp, R. G. 2019. Reactivity of Graphene Oxide with Reactive Oxygen Species (Hydroxyl Radical, Singlet Oxygen, and Superoxide Anion). *Environmental Science: Nano* 6(12): 3734-3744.
- Huang, C., Zheng, Y., Zhu, L., Li, Y., Du, L., Tao, M. & Xu, B. 2019. Demands for Perimenopausal Health Care in Women Aged 40 to 60 Years—a Hospital-Based Cross-Sectional Study in Shanghai, China. *Menopause* 26(2): 189-196.
- Jacobs, J. 2020. Differences between Older and Younger Adults with Diagnosed Cardiovascular Disease: An Analysis of Fels Study Data.
- Jahan, F. S., Abdul, R. B., Shah, R. B., Nor, A. B. I., Sharifah, N. B. & Siti, A. B. 2006. Age of Menopause and Menopausal Symptoms among Malaysian Women Who Referred to Health Clinic in Malaysia.
- Jamwal, S. & Sharma, S. 2018. Vascular Endothelium Dysfunction: A Conservative Target in Metabolic Disorders. *Inflammation Research* 67(5): 391-405.
- Jeon, H.-J. & Kwon, H.-J. 2016. Anti-Inflammation Effect of *Gynura procumbens* Extract. *Journal of Digital Convergence* 14(10): 515-520.

- Kaewseejan, N., Sutthikhum, V. & Siriamornpun, S. 2015. Potential of *Gynura procumbens* Leaves as Source of Flavonoid-Enriched Fractions with Enhanced Antioxidant Capacity. *Journal of Functional Foods* 12(120-128).
- Kaleem, A., Aziz, S. & Iqtedar, M. 2015. Investigating Changes and Effect of Peroxide Values in Cooking Oils Subject to Light and Heat. *FUUAST Journal of Biology* 5(2): 191-196.
- Kalogianni, E., Karapantsios, T. & Miller, R. 2011. Effect of Repeated Frying on the Viscosity, Density and Dynamic Interfacial Tension of Palm and Olive Oil. *Journal of Food Engineering* 105(1): 169-179.
- Kamaruzaman, K. A., Aizat, W. M. & Mat Noor, M. 2018. *Gynura procumbens* Improved Fertility of Diabetic Rats: Preliminary Study of Sperm Proteomic. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018.
- Kapourchali, F. R., Surendiran, G., Chen, L., Uitz, E., Bahadori, B. & Moghadasian, M. H. 2014. Animal Models of Atherosclerosis. *World Journal of Clinical Cases: WJCC* 2(5): 126.
- Kashefi, A., Rashidy-Pour, A., Vafaei, A. A., Haghparast, A., Tomaz, C. & Ahmadalipour, A. 2020. Corticosterone Impairs Contextual Fear Recall after Reactivation in the Ovariectomized Rat Model of Menopause. *Behavioural Brain Research* 394(112817).
- Keng, C. L., Yee, L. S. & Pin, P. L. 2009. Micropropagation of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. An Important Medicinal Plant. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(3): 105-111.
- Kershaw, K. N., Lewis, T. T., Roux, A. V. D., Jenny, N. S., Liu, K., Penedo, F. J. & Carnethon, M. R. 2016. Self-Reported Experiences of Discrimination and Inflammation among Men and Women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Health Psychology* 35(4): 343.
- Kianoush, S., Yakoob, M. Y., Al-Rifai, M., Defilippis, A. P., Bittencourt, M. S., Duncan, B. B., Bensenor, I. M., Bhatnagar, A., Lotufo, P. A. & Blaha, M. J. 2017. Associations of Cigarette Smoking with Subclinical Inflammation and Atherosclerosis: Elsa-Brasil (the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health). *Journal of the American Heart Association* 6(6): e005088.
- Kim, H., Bae, S., Kim, Y., Cho, C.-H., Kim, S. J., Kim, Y.-J., Lee, S.-P., Kim, H.-R., Hwang, Y.-I. & Kang, J. S. 2013. Vitamin C Prevents Stress-Induced Damage on the Heart Caused by the Death of Cardiomyocytes, through Down-Regulation of the Excessive Production of Catecholamine, Tnf-A, and Ros Production in Gulo (-/-) Vit C-Insufficient Mice. *Free Radical Biology and Medicine* 65(573-583).
- Kim, M.-J., Lee, H. J., Wiryowidagdo, S. & Kim, H. K. 2006. Antihypertensive Effects of *Gynura procumbens* Extract in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Medicinal Food* 9(4): 587-590.

- Koelwyn, G. J., Corr, E. M., Erbay, E. & Moore, K. J. 2018. Regulation of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis. *Nature immunology* 19(6): 526-537.
- Koenig, W. 2013. High-Sensitivity C-Reactive Protein and Atherosclerotic Disease: From Improved Risk Prediction to Risk-Guided Therapy. *International journal of cardiology* 168(6): 5126-5134.
- Krishnan, V., Ahmad, S. & Mahmood, M. 2015. Antioxidant Potential in Different Parts and Callus of *Gynura procumbens* and Different Parts of *Gynura Bicolor*. *BioMed research international* 2015.
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R.-P. & Jung, F. 2019. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International journal of molecular sciences* 20(18): 4411.
- Lapointe, A., Couillard, C. & Lemieux, S. 2006. Effects of Dietary Factors on Oxidation of Low-Density Lipoprotein Particles. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 17(10): 645-658.
- Laqif, A., Anwar, D. K. D. & Melinawati, E. 2018. Effect of Ovarian Autotransplantation on Fsh Levels in Wistar Rats Late Menopause Model. *Majalah Obstetri & Ginekologi* 26(1): 42-47.
- Lee, J., Cho, J.-Y. & Kim, W.-K. 2014. Anti-Inflammation Effect of Exercise and Korean Red Ginseng in Aging Model Rats with Diet-Induced Atherosclerosis. *Nutrition research and practice* 8(3): 284-291.
- Leong, X.-F., Mustafa, M. R., Das, S. & Jaarin, K. 2010. Association of Elevated Blood Pressure and Impaired Vasorelaxation in Experimental Sprague-Dawley Rats Fed with Heated Vegetable Oil. *Lipids in Health and Disease* 9(1): 66.
- Leong, X.-F., Najib, M. N. M., Das, S., Mustafa, M. R. & Jaarin, K. 2009. Intake of Repeatedly Heated Palm Oil Causes Elevation in Blood Pressure with Impaired Vasorelaxation in Rats. *The Tohoku journal of experimental medicine* 219(1): 71-78.
- Leong, X.-F., Ng, C.-Y. & Jaarin, K. 2015. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *BioMed research international* 2015.
- Li, H., Cen, K., Sun, W. & Feng, B. 2020. Predictive Value of Blood Interleukin-6 Level in Patients with Acute Coronary Syndrome: A Meta-Analysis. *Immunological Investigations* 1-13.
- Li, J., Cai, W., Sun, D. & Liu, Y. 2016. A Quick Method for Determining Total Polar Compounds of Frying Oils Using Electric Conductivity. *Food Analytical Methods* 9(5): 1444-1450.

- Li, J., Qin, Y., Yu, X., Xiong, Z., Zheng, L., Sun, Y., Shen, J., Guo, N., Tao, L. & Deng, Z. 2019. In Vitro Simulated Digestion and in Vivo Metabolism of Chlorogenic Acid Dimer from *Gynura procumbens* (Lour.) Merr.: Enhanced Antioxidant Activity and Different Metabolites of Blood and Urine. *Journal of Food Biochemistry* 43(6): e12654.
- Li, J.-E., Wang, W.-J., Zheng, G.-D. & Li, L.-Y. 2017a. Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Polysaccharides from *Gynura procumbens* Leaves by Fractional Precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules* 95(719-724).
- Li, T., Liu, X., Zhao, Z., Ni, L. & Liu, C. 2017b. Sulodexide Recovers Endothelial Function through Reconstructing Glycocalyx in the Balloon-Injury Rat Carotid Artery Model. *Oncotarget* 8(53): 91350.
- Libby, P. 2012. Inflammation in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(9): 2045-2051.
- Lingappan, K. 2018. Nf-Kb in Oxidative Stress. *Current opinion in toxicology* 7(81-86).
- Liu, M., He, M., Gao, H., Guo, S., Jia, J., Ouyang, H., Feng, Y. & Yang, S. 2019. Strategy for Rapid Screening of Antioxidant and Anti-Inflammatory Active Ingredients in *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. Based on UHPLC-Q-ToF-MS/MS and Characteristic Ion Filtration. *Biomedical Chromatography* 33(11): e4635.
- Loganathan, R., Tarmizi, A. H. A., Vethakkan, S. R. & Teng, K.-T. 2020. Retention of Carotenes and Vitamin E, and Physico-Chemical Changes Occurring Upon Heating Red Palm Olein Using Deep-Fat Fryer, Microwave Oven and Conventional Oven. *Journal of oleo science* 69(3): 167-183.
- Lum, H. & Roebuck, K. A. 2001. Oxidant Stress and Endothelial Cell Dysfunction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 280(4): C719-C741.
- Lushchak, V. I. 2014. Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Its Classification. *Chemico-biological interactions* 224(164-175).
- Maas, A. H. & Appelman, Y. E. 2010. Gender Differences in Coronary Heart Disease. *Netherlands Heart Journal* 18(12): 598-603.
- Mahmood, A., Mariod, A. A., Al-Bayaty, F. & Abdel-Wahab, S. I. 2010. Anti-Ulcerogenic Activity of *Gynura procumbens* Leaf Extract against Experimentally-Induced Gastric Lesions in Rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(8): 685-691.
- Manicam, C., Ginter, N., Li, H., Xia, N., Goloborodko, E., Zadeh, J. K., Musayeva, A., Pfeiffer, N. & Gericke, A. 2017. Compensatory Vasodilator Mechanisms in the Ophthalmic Artery of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Knockout Mice. *Scientific reports* 7(1): 1-12.

- Martín-Polvillo, M., Márquez-Ruiz, G. & Dobarganes, M. 2004. Oxidative Stability of Sunflower Oils Differing in Unsaturation Degree During Long-Term Storage at Room Temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81(6): 577-583.
- Martinez-Pinna, R., Barbas, C., Blanco-Colio, L. M., Tunon, J., Ramos-Mozo, P., Lopez, J. A., Meilhac, O., Michel, J.-B., Egido, J. & Martin-Ventura, J. L. 2010. Proteomic and Metabolomic Profiles in Atherothrombotic Vascular Disease. *Current atherosclerosis reports* 12(3): 202-208.
- Matsuda, M. & Shimomura, I. 2013. Increased Oxidative Stress in Obesity: Implications for Metabolic Syndrome, Diabetes, Hypertension, Dyslipidemia, Atherosclerosis, and Cancer. *Obesity research & clinical practice* 7(5): e330-e341.
- Mendis, S., Puska, P. & Norrving, B. 2011. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. World Health Organization.
- Messner, B. & Bernhard, D. 2014. Smoking and Cardiovascular Disease: Mechanisms of Endothelial Dysfunction and Early Atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34(3): 509-515.
- Michel, N. A., Zirlik, A. & Wolf, D. 2017. Cd40l and Its Receptors in Atherothrombosis—an Update. *Frontiers in cardiovascular medicine* 4(40).
- Milutinović, A., Šuput, D. & Zorc-Plesković, R. 2020. Pathogenesis of Atherosclerosis in the Tunica Intima, Media, and Adventitia of Coronary Arteries: An Updated Review. *Bosnian journal of basic medical sciences* 20(1): 21.
- Montone, R. A., Niccoli, G., Fracassi, F., Russo, M., Gurgoglione, F., Cammà, G., Lanza, G. A. & Crea, F. 2018. Patients with Acute Myocardial Infarction and Non-Obstructive Coronary Arteries: Safety and Prognostic Relevance of Invasive Coronary Provocative Tests. *European heart journal* 39(2): 91-98.
- Mounts, T. L. 2018. Frying Oils and Salad Oils. *Lipid Technologies and Applications* 433-451.
- Murugesu, K., Murugaiyah, V., Saghir, S. A., Asmawi, M. & Sadikun, A. 2017. Caffeoylquinic Acids Rich Versus Poor Fractions of *Gynura procumbens*: Their Comparative Antihyperlipidemic and Antioxidant Potential. *Current pharmaceutical biotechnology* 18(14): 1132-1140.
- Naftolin, F., Friedenthal, J., Nachtigall, R. & Nachtigall, L. 2019. Cardiovascular Health and the Menopausal Woman: The Role Of.
- Nasiruddin, M. & Sinha, S. N. 2020. Phytochemical Screening and Antioxidant, Antibacterial Efficacy of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. *Asian Journal of Medical and Biological Research* 6(2): 187-195.

- Nazri, A., Azidah, K., Fauzi, N. M., Buang, F., Saad, M., Haji, Q., Husain, K., Jantan, I. & Jubri, Z. 2019. *Gynura procumbens* Standardised Extract Reduces Cholesterol Levels and Modulates Oxidative Status in Postmenopausal Rats Fed with Cholesterol Diet Enriched with Repeatedly Heated Palm Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019.
- Ng, C.-Y., Kamisah, Y., Faizah, O., Jubri, Z., Qodriyah, H. M. S. & Jaarin, K. 2012. Involvement of Inflammation and Adverse Vascular Remodelling in the Blood Pressure Raising Effect of Repeatedly Heated Palm Oil in Rats. *International journal of vascular medicine* 2012.
- Ng, C.-Y., Leong, X.-F., Masbah, N., Adam, S. K., Kamisah, Y. & Jaarin, K. 2014. Heated Vegetable Oils and Cardiovascular Disease Risk Factors. *Vascular pharmacology* 61(1): 1-9.
- Nour, A. H., Mohamed, A. N., Idris, A. A., Omer, A. B. & Sulieman, M. B. 2018. Distribution of Fatty Acids in Fresh and Thermally Treated.
- Onishi, K. 2017. Total Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) as an Independent Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Journal of Cardiology* 70(2): 128-134.
- Packard, R. R. & Libby, P. 2008. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clinical chemistry* 54(1): 24-38.
- Patel, A. K., Suri, H. S., Singh, J., Kumar, D., Shafique, S., Nicolaides, A., Jain, S. K., Saba, L., Gupta, A. & Laird, J. R. 2016. A Review on Atherosclerotic Biology, Wall Stiffness, Physics of Elasticity, and Its Ultrasound-Based Measurement. *Current atherosclerosis reports* 18(12): 83.
- Paunović, D. M., Demin, M. A., Petrović, T. S., Marković, J. M., Vujasinović, V. B. & Rabrenović, B. B. 2020. Quality Parameters of Sunflower Oil and Palm Olein During Multiple Frying. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade* 65(1): 61-68.
- Pirillo, A., Norata, G. D. & Catapano, A. L. 2013. Lox-1, Oxldl, and Atherosclerosis. *Mediators of inflammation* 2013.
- Poh, T.-F., Ng, H.-K., Hoe, S.-Z. & Lam, S.-K. 2013. *Gynura procumbens* Causes Vasodilation by Inhibiting Angiotensin Ii and Enhancing Bradykinin Actions. *Journal of cardiovascular pharmacology* 61(5): 378-384.
- Poledne, R. & Jurcikova-Novotna, L. 2017. Experimental Models of Hyperlipoproteinemia and Atherosclerosis. *Physiological research* 66(S69).
- Poljsak, B., Šuput, D. & Milisav, I. 2013. Achieving the Balance between Ros and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013.

- Prabha, S., Ansil, P., Nitha, A., Wills, P. & Latha, M. 2013. Anti-Atherogenic Activity of Methanolic Extract of *Gardenia Gummifera* Linn. F. On High Fat Diet Induced Atherosclerosis in Rats. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 5(2): 388-393.
- Puangpronpitag, D., Chaichanadee, S., Naowaratwattana, W., Sittiwet, C., Thammasarn, K., Luerang, A. & Kaewseejan, N. 2010. Evaluation of Nutritional Value and Antioxidative Properties of the Medicinal Plant *Gynura procumbens* Extract. *Asian Journal of Plant Sciences* 9(3): 146.
- Rahman, A. & Asad, M. 2013. Chemical and Biological Investigations of the Leaves of *Gynura procumbens*. *International Journal of Biosciences* 3(4): 36-43.
- Rasbach, E., Splitthoff, P., Bonaterra, G. A., Schwarz, A., Mey, L., Schwarzbach, H., Eiden, L. E., Weihe, E. & Kinscherf, R. 2019. Pacap Deficiency Aggravates Atherosclerosis in Apoe Deficient Mice. *Immunobiology* 224(1): 124-132.
- Rocha, D. M., Bressan, J. & Hermsdorff, H. H. 2017. The Role of Dietary Fatty Acid Intake in Inflammatory Gene Expression: A Critical Review. *Sao Paulo Medical Journal* 135(2): 157-168.
- Rong, J. X., Berman, J. W., Taubman, M. B. & Fisher, E. A. 2002. Lysophosphatidylcholine Stimulates Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22(10): 1617-1623.
- Rosidah, Yam, M., Sadikun, A. & Asmawi, M. 2008. Antioxidant Potential of *Gynura procumbens*. *Pharmaceutical biology* 46(9): 616-625.
- Rubio-Jurado, B., Iñiguez-Franco, P., Reyes, P. A., Robles, G., Salazar-Páramo, M., Zavala-Cerna, G., Riebeling, C. & Nava, A. 2012. The Clinical Significance of Coagulation and the Inflammatory Response in Autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology* 42(2): 172-180.
- Sabatine, M. S., Liu, E., Morrow, D. A., Heller, E., Mccarroll, R., Wiegand, R., Berriz, G. F., Roth, F. P. & Gerszten, R. E. 2005. Metabolomic Identification of Novel Biomarkers of Myocardial Ischemia. *Circulation* 112(25): 3868-3875.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. & Chafer, M. 2011. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews* 3(1): 1-16.
- Sarma, S., Howden, E., Carrick-Ranson, G., Lawley, J., Hearon, C., Samels, M., Everding, B., Livingston, S., Adams-Huet, B. & Palmer, M. D. 2020. Elevated Exercise Blood Pressure in Middle-Aged Women Is Associated with Altered Left Ventricular and Vascular Stiffness. *Journal of Applied Physiology* 128(5): 1123-1129.

- Sawada, N., Obama, T., Koba, S., Takaki, T., Iwamoto, S., Aiuchi, T., Kato, R., Kikuchi, M., Hamazaki, Y. & Itabe, H. 2020. Circulating Oxidized Ldl, Increased in Patients with Acute Myocardial Infarction, Is Accompanied by Heavily Modified Hdl. *Journal of Lipid Research* 61(6): 816-829.
- Saxena, T., Ali, A. O. & Saxena, M. 2018. Pathophysiology of Essential Hypertension: An Update. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 16(12): 879-887.
- Siti, H. N., Kamisah, Y., Mohamed, S. & Jaarin, K. 2019. Effects of Citrus Leaf Extract on Aortic Vascular Reactivity in Hypertensive Rats Fed Repeatedly Heated Vegetable Oil. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 44(4): 373-380.
- Spahis, S., Borys, J.-M. & Levy, E. 2017. Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. *Antioxidants & redox signaling* 26(9): 445-461.
- Sukhorukov, V. N., Khotina, V. A., Chegodaev, Y. S., Ivanova, E., Sobenin, I. A. & Orekhov, A. N. 2020. Lipid Metabolism in Macrophages: Focus on Atherosclerosis. *Biomedicines* 8(8): 262.
- Summerhill, V. I., Grechko, A. V., Yet, S.-F., Sobenin, I. A. & Orekhov, A. N. 2019. The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis. *International journal of molecular sciences* 20(14): 3561.
- Sunarwidhi, A. L., Sudarsono, S. & Nugroho, A. E. 2014. Hypoglycemic Effect of Combination of *Azadirachta Indica* A. Juss. And *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. Ethanolic Extracts Standardized by Rutin and Quercetin in Alloxan-Induced Hyperglycemic Rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 4(Suppl 2): 613.
- Takei, A., Huang, Y. & Lopes-Virella, M. F. 2001. Expression of Adhesion Molecules by Human Endothelial Cells Exposed to Oxidized Low Density Lipoprotein: Influences of Degree of Oxidation and Location of Oxidized Ldl. *Atherosclerosis* 154(1): 79-86.
- Tan, H.-L., Chan, K.-G., Pusparajah, P., Lee, L.-H. & Goh, B.-H. 2016. *Gynura procumbens*: An Overview of the Biological Activities. *Frontiers in pharmacology* 7(52).
- Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. 2018. Interleukin (Il-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10(8): a028456.
- Tarmizi, A. H. A., Ismail, R. & Kuntom, A. 2016. Effect of Frying on the Palm Oil Quality Attributes—a Review. *Journal of Oil Palm Research* 28(2): 143-153.

- Teul, J., Rupérez, F. J., Garcia, A., Vaysse, J., Balayssac, S., Gilard, V., Malet-Martino, M., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L. M. & Tu. ÓN, J. 2009. Improving Metabolite Knowledge in Stable Atherosclerosis Patients by Association and Correlation of Gc-Ms and 1h Nmr Fingerprints. *Journal of Proteome Research* 8(12): 5580-5589.
- Thangiah, N., Chinna, K., Su, T. T., Jalaludin, M. Y., Al-Sadat, N. & Majid, H. A. 2020. Clustering and Tracking the Stability of Biological Cvd Risk Factors in Adolescents: The Malaysian Health and Adolescents Longitudinal Research Team Study (Myhearts). *Frontiers in Public Health* 8.
- Thurston, R. C. & Joffe, H. 2011. Vasomotor Symptoms and Menopause: Findings from the Study of Women's Health across the Nation. *Obstetrics and Gynecology Clinics* 38(3): 489-501.
- Timotius, K. H. & Rahayu, I. 2020. Overview of Herbal Therapy with Leave of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. *Journal of Young Pharmacists* 12(3).
- Tompkins, C. & Perkins, E. G. 2000. Frying Performance of Low-Linolenic Acid Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77(3): 223-229.
- Totani, N., Yasaki, N., Doi, R. & Hasegawa, E. 2017. Active Cooling of Oil after Deep-Frying. *Journal of oleo science* 66(10): 1095-1100.
- Trajanoska, K., Morris, J. A., Oei, L., Zheng, H.-F., Evans, D. M., Kiel, D. P., Ohlsson, C., Richards, J. B. & Rivadeneira, F. 2018. Assessment of the Genetic and Clinical Determinants of Fracture Risk: Genome Wide Association and Mendelian Randomisation Study. *Bmj* 362(k3225).
- Trpkovic, A., Resanovic, I., Stanimirovic, J., Radak, D., Mousa, S. A., Cenic-Milosevic, D., Jevremovic, D. & Isenovic, E. R. 2015. Oxidized Low-Density Lipoprotein as a Biomarker of Cardiovascular Diseases. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 52(2): 70-85.
- Tsikas, D. 2017. Assessment of Lipid Peroxidation by Measuring Malondialdehyde (Mda) and Relatives in Biological Samples: Analytical and Biological Challenges. *Analytical biochemistry* 524(13-30).
- Van Hinsbergh, V. W. 2012. Endothelium—Role in Regulation of Coagulation and Inflammation. *Seminars in immunopathology*, hlm. 93-106.
- Vik, A. & Hansen, T. V. 2018. Synthetic Manipulations of Polyunsaturated Fatty Acids as a Convenient Strategy for the Synthesis of Bioactive Compounds. *Organic & biomolecular chemistry* 16(48): 9319-9333.
- Vilahur, G., Ben-Aicha, S. & Badimon, L. 2017. New Insights into the Role of Adipose Tissue in Thrombosis. *Cardiovascular research* 113(9): 1046-1054.

- Wang, C., Chen, H., Zhu, W., Xu, Y., Liu, M., Zhu, L., Yang, F., Zhang, L., Liu, X. & Zhong, Z. 2017a. Nicotine Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice by Activating A7 Nicotinic Acetylcholine Receptor on Mast Cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37(1): 53-65.
- Wang, C., Petriello, M. C., Zhu, B. & Hennig, B. 2019. Pcb 126 Induces Monocyte/Macrophage Polarization and Inflammation through Ahr and Nf-Kb Pathways. *Toxicology and applied pharmacology* 367(71-81).
- Wang, Z., Wang, D. & Wang, Y. 2017b. Cigarette Smoking and Adipose Tissue: The Emerging Role in Progression of Atherosclerosis. *Mediators of inflammation* 2017.
- Wang, Z.-Q., Yan, J.-C., Sun, Z., Bao, Z.-Y., Shao, C., Pang, Q.-W., Geng, Y., Zhang, L.-L. & Li, L.-H. 2018. Role of Ages in the Progression and Regression of Atherosclerotic Plaques. *Glycoconjugate journal* 35(5): 443-450.
- Wojta, J. 2019. Vascular Smooth Muscle Cells: Regulation of Vasoconstriction and Vasodilation. Dlm. (pnyt.). *Fundamentals of Vascular Biology*, hlm. 97-111. Springer.
- Yamada, C., Kishimoto, N., Urata, N., Kimura, M., Toyoda, M., Masuda, Y., Takashimizu, S., Ishii, N., Kubo, A. & Nishizaki, Y. 2020. Relationship between Serum Antioxidative Vitamin Concentrations and Type 2 Diabetes in Japanese Subjects. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 66(4): 289-295.
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G. & Muyan, M. 2017. Molecular Mechanism of Estrogen-Estrogen Receptor Signaling. *Reproductive medicine and biology* 16(1): 4-20.
- Yee, T., Loganathan, R. & Tiu, T. K. 2018. Oxidative Changes in Repeatedly Heated Vegetable Oils. *Journal of Oil Palm Research* 30(4): 635-641.
- Yi, Q., Ji, J., Shen, B., Dong, C., Liu, J., Zhang, J. & Xing, M. 2019. Singlet Oxygen Triggered by Superoxide Radicals in a Molybdenum Cocatalytic Fenton Reaction with Enhanced Redox Activity in the Environment. *Environmental science & technology* 53(16): 9725-9733.
- Yin, H. & Porter, N. A. 2005. New Insights Regarding the Autoxidation of Polyunsaturated Fatty Acids. *Antioxidants & redox signaling* 7(1-2): 170-184.
- Yu, H., Huang, Y., Chen, X., Nie, W., Wang, Y., Jiao, Y., Reed, G. L., Gu, W. & Chen, H. 2017. High-Sensitivity C-Reactive Protein in Stroke Patients—the Importance in Consideration of Influence of Multiple Factors in the Predictability for Disease Severity and Death. *Journal of Clinical Neuroscience* 36(12-19).

- Yuan, M., Zhan, Q., Duan, X., Song, B., Zeng, S., Chen, X., Yang, Q. & Xia, J. 2013. A Functional Polymorphism at Mir-491-5p Binding Site in the 3'-Utr of Mmp-9 Gene Confers Increased Risk for Atherosclerotic Cerebral Infarction in a Chinese Population. *Atherosclerosis* 226(2): 447-452.
- Zaromitidou, M., Siasos, G., Papageorgiou, N., Oikonomou, E. & Tousoulis, D. 2016. Atherosclerosis and Coronary Artery Disease: From Basics to Genetics. Dlm. (pnyt.). *Cardiovascular Diseases*, hlm. 3-24. Elsevier.
- Zhang, H., Wang, L., Peng, F., Wang, X. & Gong, H. 2020. L-Arginine Ameliorates High-Fat Diet-Induced Atherosclerosis by Downregulating Mir-221. *BioMed research international* 2020.
- Zhong, L., Simard, M. J. & Huot, J. 2018. Endothelial Micrnas Regulating the Nf-Kb Pathway and Cell Adhesion Molecules During Inflammation. *The FASEB Journal* 32(8): 4070-4084.
- Zimmermann, H. W., Trautwein, C. & Tacke, F. 2012. Functional Role of Monocytes and Macrophages for the Inflammatory Response in Acute Liver Injury. *Frontiers in physiology* 3(56).
- Zmysłowski, A. & Szterk, A. 2017. Current Knowledge on the Mechanism of Atherosclerosis and Pro-Atherosclerotic Properties of Oxysterols. *Lipids in Health and Disease* 16(1): 188.

## LAMPIRAN A

**SURAT KELULUSAN JAWATANKUASA ETIKA PENGGUNAAN HAIWAN  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA (UKMAEC)**



**UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
ANIMAL ETHICS COMMITTEE**

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



28<sup>th</sup> September, 2016

UKMAEC APPROVAL NUMBER:	<b>BIOK/PP/2016/ZAKIAH/28-SEPT./779-SEPT.-2016- JAN.-2019</b>
CHIEF INVESTIGATOR:	<b>Assoc. Prof. Dr. Zakiah Jubri @ Mohd Zufri</b>
DIVISION/DEPT. OF CHIEF INVESTIGATOR:	<b>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia.</b>
FUNDING INSTITUTION (S):	<b>Skim Geran Penyelidikan NKEA Herba EPP#1</b>
GRANT NUMBER (S):	<b>NH1015D076</b>
PROJECT TITLE:	<b>Effects of the standardized extract of <i>Gynura procumbens</i> on plaque formation, vascular reactivity and inflammatory response in atherosclerotic rat model.</b>
CO-INVESTIGATOR:	<b>Prof. Dr. Ibarahim Jantan Assoc. Prof. Dr. Qodriyah Mohd Saad Dr. Norsyahida Mohd Fauzi Dr. Fhataheya Buang</b>
STUDENT:	<b>Khuzaidatul Azidah bt Ahmad Nazri</b>
OTHER AUXILIARIES:	<b>-</b>
PROJECT CLASSIFICATION:	<b>C</b>
SOURCE OF ANIMALS:	<b>LARU, UKM.</b>
HOUSING-LOCATION OF ANIMALS DURING PROJECT:	<b>Dept. of Biochemistry, UKM.</b>
ESTIMATED DURATION OF PROJECT:	<b>From September 2016 to January 2020</b>

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



Low Kiat Cheong  
Secretary of UKMAEC  
Universiti Kebangsaan Malaysia

## LAMPIRAN B

## SURAT KELULUSAN MENJALANKAN PENYELIDIKAN



Jawatankuasa Etika Haiwan

Animal Ethics Committee

UKM (AEC) PPI.1/138/1  
10hb. Oktober, 2016

Profesor Madya Dr. Zakiah Jubri @ Mohd Zufri,  
Jabatan Biokimia,  
Tingkat 17, Blok Pra-Klinikal,  
Fakulti Perubatan,  
Universiti Kebangsaan Malaysia,  
Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak,  
56000 Cheras, Kuala Lumpur.

Puan,

**Kelulusan Dari Jawatankuasa Etika Penggunaan Haiwan (UKMAEC) Untuk Tajuk: "Effects of the standardized extract of *Gynura procumbens* on plaque formation, vascular reactivity and inflammatory response in atherosclerotic rat model."**

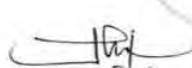
Dalam mesyuarat UKMAEC pada 28hb. September, 2016 telah memutuskan bahawa permohonan puan diluluskan. Nombor kelulusan adalah seperti berikut:

**BIOK/PP/2016/ZAKIAH/28-SEPT./779-SEPT.-2016-JAN.-2020**

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

Sekian, terima kasih.

Yang benar,

  
**PROFESOR MADYA DR. KAMISAH YUSOF**  
Pengerusi UKMAEC  
Universiti Kebangsaan Malaysia

d/a Unit Sumber Haiwan Makmal, Fakulti Perubatan, Kampus Kuala Lumpur, Universiti Kebangsaan Malaysia,  
Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia  
Telefon: +603-92895086 / 5091 / 5087 Faksimili: +603-26983743 E-mel: kuhaiwan@medic.ukm.my  
Laman Web: <http://www.ukm.my/ukmaec/>

Mengilham Harapan, Mencipta Masa Depan • *Inspiring Futures, Nurturing Possibilities*[www.ukm.my](http://www.ukm.my)

## LAMPIRAN C

## SURAT KELULUSAN DANA PENYELIDIKAN



KEMENTERIAN PERTANIAN DAN INDUSTRI ASAS TANI  
 Ministry of Agriculture and Agro-Based Industry  
 Wisma Tani  
 No. 28, Persiaran Perdana, Presint 4  
 Pusat Pentadbiran Kerajaan Persekutuan  
 62624 PUTRAJAYA  
 MALAYSIA



Tel : 603-8000 8000  
 Faks : 603-8888 6020  
 Laman Web : www.moa.gov.my

Rujukan : KP/HDO/S/158/1/61 ( i )  
 Tarikh : 30 November 2015

YBhg. Prof. Dato' Dr. Mazlin Mokhtar  
 Timbalan Naib Canselor (Penyelidikan dan Inovasi)  
 Universiti Kebangsaan Malaysia  
 43600 UKM, Bangi Selangor  
 Malaysia  
 Tel : 03-8921 5555  
 Faks : 03-8921 4097

YBhg. Prof. Dato',

**NKEA EPP#1 : TAWARAN GERAN PENYELIDIKAN NKEA HERBA (NRGS)  
 (NH1015D076) : UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA (UKM)**

Sukacita dimaklumkan bahawa Mesyuarat *Steering Committee* NKEA Pertanian Bil. 4/2015 yang bermesyuarat pada 29 Oktober 2015 telah meluluskan permohonan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) untuk mendapatkan Geran Penyelidikan NKEA Herba (NRGS) bagi projek seperti berikut:

Tajuk projek	: <i>Anti-atherosclerotic Effects of the Standardised Extract of Gynura Procumbens on Plaque Formation, Vascular Reactivity, Inflammation and Cellular Signalling</i>
Jumlah peruntukan	: RM 280,000.00
Tempoh penyelidikan	: 24 bulan (1 Februari 2016 – 31 Januari 2018)
Ketua projek	: Dr. Zakiah binti Jubri @ Mohd Zufri

2. Untuk makluman YBhg. Prof. Dato', kelulusan peruntukan dan projek penyelidikan ini adalah tertakluk kepada syarat-syarat terkandung dalam Garis Panduan NRGS seperti berikut:

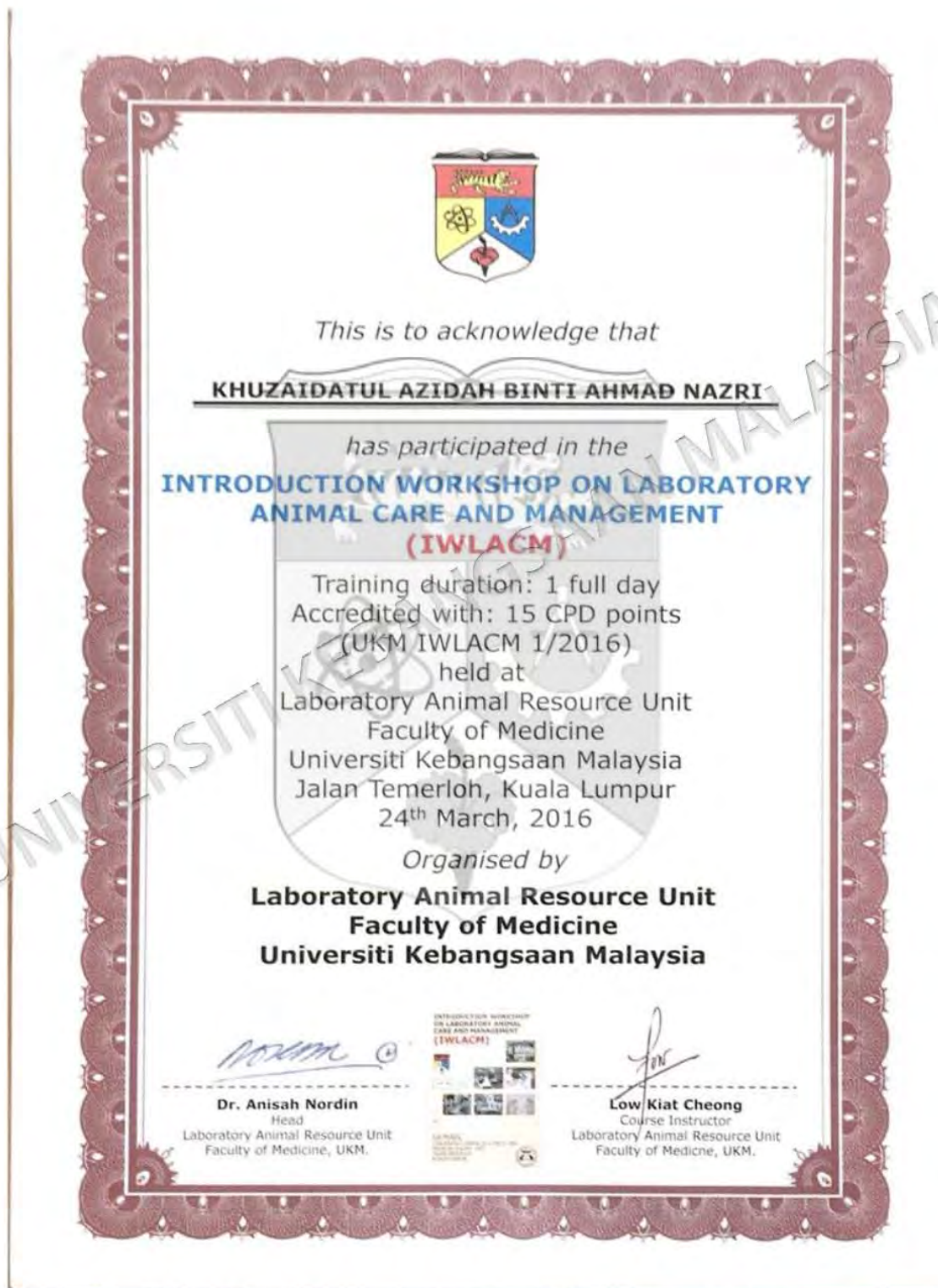
- i) Projek penyelidikan yang diluluskan dan menerima peruntukan di bawah NRGS tidak dibenarkan menerima sebarang peruntukan daripada kementerian/agensi lain bagi projek penyelidikan yang sama;

JIHAD MEMERANGI ORANG TENGAH



## LAMPIRAN D

## BENGKEL PENGENDALIAN HAIWAN



## LAMPIRAN E

## JURNAL YANG TELAH DITERBITKAN

Hindawi  
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine  
Volume 2019, Article ID 7246756, 15 pages  
<https://doi.org/10.1155/2019/7246756>



## Research Article

## ***Gynura procumbens* Standardised Extract Reduces Cholesterol Levels and Modulates Oxidative Status in Postmenopausal Rats Fed with Cholesterol Diet Enriched with Repeatedly Heated Palm Oil**

Khuzaidatul Azidah Ahmad Nazri<sup>1</sup>, Norsyahida Mohd Fauzi<sup>2</sup>, Fhataheya Buang<sup>2</sup>, Qodriyah Haji Mohd Saad<sup>3</sup>, Khairana Husain<sup>2</sup>, Ibrahim Jantan<sup>4</sup>, and Zakiah Jubri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, The National University of Malaysia Medical Centre (UKMMC), Kuala Lumpur, Malaysia

<sup>2</sup>Drug and Herbal Research Centre, Faculty of Pharmacy, The National University of Malaysia Campus Kuala Lumpur, Kuala Lumpur, Malaysia

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, The National University of Malaysia Medical Centre (UKMMC), Kuala Lumpur, Malaysia

<sup>4</sup>School of Pharmacy, Taylor's University, Lakeside Campus, 47500 Subang Jaya, Selangor, Malaysia

Correspondence should be addressed to Zakiah Jubri; [zakiah.jubri@ppukm.ukm.edu.my](mailto:zakiah.jubri@ppukm.ukm.edu.my)

Received 18 June 2019; Revised 12 August 2019; Accepted 26 August 2019; Published 23 September 2019

Academic Editor: Kuttulebbal N. S. Strajudeen

Copyright © 2019 Khuzaidatul Azidah Ahmad Nazri et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Gynura procumbens* (Lour.) Merr. (GP) has been reported in previous studies to possess antihyperlipidaemic, antioxidative, and cardioprotective properties. This study was aimed to determine the effect of standardised 80% ethanol extract of GP on lipid profiles and oxidative status of hypercholesterolemic rats. Postmenopausal (PM) Sprague-Dawley rats were ovariectomised and fed with 2% cholesterol diet fortified with five times heated palm oil to develop hyperlipidaemia status. Two doses of the extract (250 and 500 mg/kg) and atorvastatin (10 mg/kg) were administered once daily via oral gavage for 24 weeks. Systolic blood pressure (SBP) was increased during the first month in the postmenopausal group and decreased with GP supplementation. Lipid droplets accumulation was shown at the tunica media (TM) area of the aorta in the postmenopausal group and reduced with GP supplementation. Total cholesterol (TC), total triglycerides (TG), low-density lipoprotein (LDL), and malondialdehyde (MDA) levels increased ( $p < 0.05$ ) at 3 and 6 months in the postmenopausal group and were reduced with GP supplementation. GP also increased high-density lipoprotein (HDL) level in the postmenopausal group. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) activities were reduced in the postmenopausal group compared to control in the sham group but increased ( $p < 0.05$ ) with GP supplementation. The results showed that the higher dose of GP (500 mg/kg) gave better effect. GP has the ability to reduce oxidative stress and prevent membrane cell damage through antioxidant enzyme activity modification and lipid profile changes in postmenopausal rats related to atherosclerosis.

### 1. Introduction

The World Health Organization (WHO) reported that cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death globally. The National Health and Morbidity Survey of Malaysia reported in 2015 that at least 63% of adults aged 18 years and above had at least one CVD risk factor [1]. The

Malaysian Ministry of Health has speculated that CVD incidents will increase to 23.3 million cases in 2030 [2]. In comparison between women and men at matched-age, women have lower risk for cardiovascular diseases especially atherosclerosis. However, when women reached menopause, the incidence of atherosclerosis increases drastically [3]. Studies reported that menopausal women at the age of 55

## LAMPIRAN F

## JURNAL YANG TELAH DITERBITKAN

Sains Malaysiana 50(5)(2021): 1457-1466  
<http://doi.org/10.17576/jsm-2021-5005-24>

### Palm Tocotrienol-Rich Fraction Protects Neonatal Rat Cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Damage

(Fraksi Kaya Tocotrienol Sawit Melindungi Kardiomiosit Tikus Neonatal daripada Induksi Kerosakan Pengoksidaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

NOOR SHAREENA AISHA ABDUL KHALID, KHUZAIDATUL AZIDAH AHMAD NAZRI & ZAKIAH JUBRI\*

## ABSTRACT

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of heart disease. Tocotrienol-rich fraction (TRF) is an antioxidant and that has the potential to reduce the risk of heart disease. This study is to determine the protective effects of palm TRF against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in neonatal rat cardiomyocytes (NRCM). The NRCM were divided into control, treated with TRF (10 µg/mL), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM) and treated with TRF prior to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction (pre-treatment). Cell viability was determined by the MTS assay, while the presence of reactive oxygen species (ROS) was determined using fluorescent dihydroethidium (DHE) and 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA) dye. Mitochondrial integrity and cell death were determined using JC-1 and Annexin V-FITC staining, respectively. Lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) activity were determined by colorimetric assay kit. The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from 0.5 to 5 mM reduced the cell viability and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> IC<sub>50</sub> value of 0.5 mM was used in the experiment. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction increased the intensity of carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA and DHE-stains; and also the intensity of green fluorescence of J-monomers in JC-1 staining compared to the control group. The activity of LDH increased while the activity of SOD decreased in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. Pre-treatment with TRF reduced the intensities of carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA and DHE-stains, as well as the green fluorescence of J-monomers in JC-1. Meanwhile, the LDH activity was reduced in the pre-treatment group but no changes were recorded in SOD activity compared to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. Palm TRF protects cardiomyocytes from oxidative damage by reducing ROS production and maintaining the mitochondrial membrane integrity thus reducing cell death.

Keywords: Cardiomyocytes; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; oxidative damage; tocotrienol-rich fraction

## ABSTRAK

Tekanan oksidatif memainkan peranan penting dalam patogenesis penyakit jantung. Fraksi kaya tokotrienol (TRF) adalah antioksidan dan berpotensi mengurangkan risiko penyakit jantung. Kajian ini adalah untuk mengetahui kesan pelindung TRF sawit terhadap kerosakan oksidatif aruhan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada kardiomiosit tikus neonatal (NRCM). NRCM dibahagi kepada kawalan, dirawat dengan TRF (10 µg/mL), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM) dan dirawat dengan TRF sebelum induksi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pra-rawatan). Kebolehhidupan sel ditentukan dengan ujian MTS. Kehadiran ROS ditentukan menggunakan pewarna dihidroetidium (DHE) dan pewarna 5-(dan-6)-karboksi-2',7'-diklorodihidrofluorescein diasetat (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA). Integriti mitokondria dan kematian sel ditentukan menggunakan pewarnaan JC-1 dan Annexin V-FITC masing-masing. Aktiviti laktat dehidrogenase (LDH) dan superoksid dismutase (SOD) ditentukan menggunakan kit esei kalorimetrik. Kepekatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bermula daripada 0.5 hingga 5 mM menurunkan kebolehhidupan sel dan nilai IC<sub>50</sub> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM digunakan di dalam kajian ini. Aruhan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> meningkatkan keamatan karboksi-H<sub>2</sub>DCFDA dan pewarnaan DHE; dan juga keamatan pendarfluor hijau monomer-J dalam pewarnaan JC-1 berbanding kumpulan kawalan. Aktiviti LDH meningkat sementara aktiviti SOD menurun dalam kumpulan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pra-rawatan dengan TRF menurunkan keamatan karboksi-H<sub>2</sub>DCFDA dan pewarnaan DHE; dan juga keamatan pendarfluor hijau monomer-J dalam pewarnaan JC-1. Manakala aktiviti LDH menurun dalam kumpulan pra-rawatan tetapi tiada perubahan ditunjukkan dalam aktiviti SOD berbanding kumpulan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. TRF sawit melindungi kardiomiosit daripada kerosakan oksidatif melalui pengurangan penghasilan ROS dan mengekalkan integriti membran mitokondria seterusnya mengurangkan kematian sel.

Kata kunci: Fraksi kaya tokotrienol; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; kardiomiosit; kerosakan oksidatif

## LAMPIRAN G

## JURNAL YANG TELAH DITERBITKAN

PHARMACEUTICAL BIOLOGY  
2021, VOL. 59, NO. 1, 1203–1215  
<https://doi.org/10.1080/13880209.2021.1970199>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS Check for updates

## *Gynura procumbens* ethanol extract improves vascular dysfunction by suppressing inflammation in postmenopausal rats fed a high-fat diet

Khuzaidatul Azidah Ahmad Nazri<sup>a</sup>, Qodriyah Haji Mohd Saad<sup>b</sup>, Norsyahida Mohd Fauzi<sup>c</sup>, Fhatahaya Buang<sup>c</sup>, Ibrahim Jantan<sup>d</sup> and Zakiah Jubri<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre (UKMMC), Kuala Lumpur, Malaysia; <sup>b</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre (UKMMC), Kuala Lumpur, Malaysia; <sup>c</sup>Drug and Herbal Research Centre, Faculty of Pharmacy, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia; <sup>d</sup>Institute of Systems Biology (INBIOIS), Universiti Kebangsaan Malaysia, UKM Bangi, Bangi, Malaysia

### ABSTRACT

**Context:** *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. (Asteraceae) has been reported to have various pharmacological activities including anti-inflammatory effects.

**Objective:** This study sought to determine whether *Gynura procumbens* (GP) could improve vascular reactivity by suppressing inflammation in postmenopausal rats fed with five-times heated palm oil (5HPO) diet.

**Materials and methods:** Forty-eight female Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham [non-ovariectomized; grouped as control, GP extracts (250 and 500 mg/kg), atorvastatin (ATV, 10 mg/kg)] and postmenopausal (PM) groups [ovariectomized rats fed with 5HPO; grouped as PM, GP extracts (250 and 500 mg/kg) and ATV (10 mg/kg)]. Each group ( $n = 6$ ) was either supplemented with GP extract or ATV orally once daily for 6 months.

**Results:** In comparison with the untreated PM group, 250 and 500 mg/kg GP supplementation to PM groups reduced the systolic blood pressure ( $103 \pm 2.7$ ,  $86 \pm 2.4$  vs.  $156 \pm 7.83$  mmHg,  $p < 0.05$ ), intima-media thickness ( $101.28 \pm 3.4$ ,  $93.91 \pm 2.93$  vs.  $143.78 \pm 3.31$   $\mu$ m), vasoconstriction percentage induced by phenylephrine (102.5%, 88.3%, vs. 51.8%), sICAM-1 (0.49, 0.26 vs. 0.56 pg/mL) and sVCAM-1 (0.39, 0.25 vs. 0.45 pg/mL). GP extract supplementation increased vasorelaxation percentage induced by acetylcholine (78.4% vs. 47.3%) and sodium nitroprusside (84.2% vs. 53.7%), increased changes in plasma nitric oxide level (1.25%, 1.31% vs. 1.9%), and suppressed the elevation of TNF- $\alpha$  (0.39 vs. 1.02 pg/mL), IL-6 (0.43 vs. 0.77 pg/mL) and CRP (0.29 vs. 0.69 ng/mL) in the PM groups.

**Conclusions:** GP extract might improve vascular dysfunction by suppressing the inflammatory response, consequently preventing blood pressure elevation.

### ARTICLE HISTORY

Received 8 February 2021  
Revised 29 June 2021  
Accepted 14 August 2021

### KEYWORDS

Blood pressure; ovariectomized; vasorelaxation; vasoconstriction; cholesterol; interleukin-6; tumour necrosis factor- $\alpha$ ; C-reactive protein

### Introduction

Menopausal women tend to develop cardiovascular diseases (Barrett-Connor 2013; Fairweather 2014) as in male individuals. Globally, the mortality rate of cardiovascular diseases is increasing, therefore prevention of cardiovascular diseases, particularly atherosclerosis, is important (Mosca et al. 2011; Yao et al. 2019). Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease. It is indicated by the thickening and loss of elasticity of the arterial walls, leading to endothelial dysfunction and increasing blood pressure (Dinh et al. 2014). The endothelium acts as an interface between circulating blood or lymph in the lumen of the vessel wall, and protects the interior surface of blood and lymphatic vessels (Pfeiffer et al. 2008). An endothelium dysfunction occurs when the endothelium cannot maintain its vascular homeostasis due to the loss of balance between vasodilation and vasoconstriction (Rajendran et al. 2013).

Various inflammatory cells, specifically monocytes and macrophages, play a major role in the development, progression, and rupture of atherosclerotic plaques (Camicci et al. 2012; Husain et al. 2015). The oxidation of low-density lipoprotein (LDL) triggers the release of chemokines that attract blood monocytes and T lymphocytes, activates endothelium and allows the adherence and entry of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intracellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), E and P-selectin into the sub-endothelial space (Cook-Mills et al. 2011). Monocytes undergo differentiation into mature macrophages, engulf the excessive lipoproteins, and form cholesterol-enriched foam cells. The foam cells and lymphocytes release cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and monocyte chemoattractant protein-1, and maintain a constant state of chronic vascular inflammation (Fardel 2013).

The production of uncontrolled reactive oxygen species (ROS) from endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase reduces the

**CONTACT** Zakiah Jubri [zakiah.jubri@ppukm.ukm.edu.my](mailto:zakiah.jubri@ppukm.ukm.edu.my) Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre (UKMMC), Kuala Lumpur 56000, Malaysia

Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## LAMPIRAN H

ABSTRAK PEMBENTANGAN ORAL PERSIDANGAN ANTARABANGSA  
ANTIOKSIDAN DAN DAN PENYAKIT DEGENERATIF (ICADD) TAHUN 2018***Gynura procumbens* alleviates vascular inflammation and increases vascular reactivity in atherosclerosis rat model**

Ahmad Nazri, KA<sup>1</sup>, Fauzi, NM<sup>3</sup>, Buang, F<sup>3</sup>, Qodriyah, HMS<sup>2</sup>, Jantan, I<sup>3</sup>, Jubri, Z<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Department of Biochemistry, <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre (UKMMC), <sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, Universiti Kebangsaan Malaysia Campus Kuala Lumpur

Email of presenting author: gigieazidah@yahoo.com

**Background**

Atherosclerosis is the major risk factor for cardiovascular disease. *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. has been reported to have anti-hyperlipidaemic, hypertensive, antioxidative, and anti-hyperglycemic properties. To date, there is no research studied on its effect to prevent atherosclerosis development. Therefore, this study aims to determine the effect of *G.procumbens* in measuring inflammatory biomarkers and vascular reactivity in atherosclerotic rat model.

**Methods**

Forty-eight female Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into eight groups as follows; sham with (1) basal diet, (2) 250G.procumbens; (3) 500G.procumbens; (4) atorvastatin (ATV); and atherosclerotic rat model with (5) 2%CHO5HPO; (6) 2%CHO5HPO250G.procumbens; (7) 2%CHO5HPO500G.procumbens; (8) 2%CHO5HPOATV. Treatment was given for 24 weeks. Blood pressure was measured at baseline and at monthly interval of six months. Inflammatory biomarkers (IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP) in plasma was determined using commercially available ELISA kit (Elabscience Biotechnology, USA). Rat were sacrificed and thoracic aorta were isolated for measurement of vascular reactivity.

**Results**

The increase in blood pressure starting from duration time of 0 to 6<sup>th</sup> months were associated with an increase in IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP level in plasma of atherosclerotic group (2%CHO5HPO) and reduced with *G.procumbens* extract supplementation at 250 and 500 mg/kg body weight. Vasodilator response to Ach and SNP was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in 2%CHO5HPO but increase with supplementation of *G.procumbens* extract. Aortic ring in treatment with *G.procumbens* extract supplementation were susceptible in response to PE by increase the contraction activity.

**Conclusion**

*G.procumbens* extract supplementation with the dose of 500 mg/kg body weight gave better effect than the lower dose (250 mg/kg body weight) in blood pressure control and it is reflected in IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP levels. Standardized extract of *G.procumbens* has the ability to control the vascular tone and improve the impaired endothelial function in atherosclerotic condition.

**Keywords**

*Gynura procumbens*, inflammatory biomarkers, IL-6, CRP, TNF- $\alpha$ , vascular reactivity, atherosclerosis.

## LAMPIRAN I

ABSTRAK PEMBENTANGAN POSTER PERSIDANGAN ANTARABANGSA  
ANTIOKSIDAN DAN PENYAKIT DEGENERATIF (ICADD) TAHUN 2018***Gynura procumbens* Standardized Extract Reduces Lipid Peroxidation and Cholesterol Level in Atherosclerotic Rat Model**

Ahmad Nazri, KA<sup>1</sup>, Fauzi, NM<sup>3</sup>, Buang, F<sup>3</sup>, Qadriyah, HMS<sup>2</sup>, Jantan, I<sup>3</sup>, Jubri, Z<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Department of Biochemistry, <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,  
Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre (UKMMC), Faculty of Pharmacy,  
University Kebangsaan Malaysia Campus Kuala Lumpur

Email of presenting author: zakiah.jubri@ppukm.ukm.edu.my

**Background**

Lipid peroxidation resulted from reactive oxygen species (ROS) action on membrane cell due to overproduction of ROS. It plays a role in the development of atherosclerosis whereby the oxidation of LDL-cholesterol by ROS promotes atherosclerotic plaque formation. *Gynura procumbens* (GP) has been reported to have anti-hyperlipidaemic, hypertensive, cardio-protective effect, antioxidative, anti-hyperglycemic and anti-inflammatory properties. GP might have an ability to reduce lipid oxidation and prevent atherosclerosis. This study is to determine the effect of GP standardized extract lipid peroxidation and cholesterol level in the atherosclerotic rat model.

**Methods**

Forty-eight female Sprague Dawley rats were divided into sham with (1) basal diet, (2) 250GP; (3) 500GP; (4) atorvastatin (ATV); and atherosclerotic rat model with (5) 2%CHO5HPO; (6) 2%CHO5HPO250GP; (7) 2%CHO5HPO500GP; (8) 2%CHO5HPOATV. Treatment was given for 24 weeks. Blood pressure was taken monthly and blood was collected through orbital sinus at 0, 3 and 6 months. The plasma MDA level was measured by HPLC. Cholesterol level (total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol) and total triacylglycerol (TG) was measured using spectrophotometer.

**Results**

Blood pressure was increased starting from the first month in atherosclerotic rat model (2%CHO5HPO) and reduced with extract supplementation. Serum total cholesterol, TG, LDL-cholesterol and MDA level were increased at 3 and 6-month duration in atherosclerotic rat model and was reduced with extract supplementation. GP extract increased serum HDL-cholesterol level in atherosclerotic rat model compared to the atherosclerosis group.

**Conclusion**

GP extract supplementation with the dose of 500 mg/kg body weight gave better effect than the lower dose (250 mg/kg body weight). Standardized extract of *Gynura procumbens* is able to reduce lipid peroxidation and cholesterol level in atherosclerosis.

**Keywords**

Atherosclerosis, *Gynura procumbens*, Oxidative stress, Cholesterol

## LAMPIRAN J

ABSTRAK PEMBENTANGAN POSTER PERSIDANGAN PERTUBUHAN  
JANTUNG KEBANGSAAN MALAYSIA TAHUN 2019***Gynura Procumbens* Increases Antioxidant Enzymes Activity and Reduces Endothelial Inflammatory Markers Expression in Atherosclerotic Rat Model**

Ahmad Nazri, KA<sup>1</sup>, Fauzi, NM<sup>3</sup>, Buang, F<sup>3</sup>, Qodriyah, HMS<sup>2</sup>, Jantan, I<sup>3</sup>, Jubri, Z<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre (UKMMC), <sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, Universiti Kebangsaan Malaysia Campus Kuala Lumpur

**Background** Atherosclerosis is associated with endothelial development dysfunction, inflammation and reduction of antioxidant status. *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. has been reported to have anti-hyperlipidaemic, hypertensive, antioxidative, and anti-hyperglycemic properties. There is no research studied on its effect to prevent atherosclerosis development.

**Objective** This study aimed to determine the effect of *G. procumbens* on antioxidant enzymes activity and endothelial inflammatory markers in atherosclerotic rat model.

**Materials & Methods** Forty-eight female Sprague Dawley rats were divided into sham and ovariectomized groups. They were further divided into eight groups; control, 250GP, 500GP, atorvastatin (ATV); atherosclerotic; atherosclerotic+250GP; atherosclerotic+500GP; atherosclerotic+ATV. Treatment was given for 24 weeks. Body weight and blood pressure were measured at baseline and at monthly interval of six months. Antioxidant enzymes (CAT, GPx and SOD) activity in erythrocytes and expression of ICAM-1 and VCAM-1 in thoracic aorta were measured using commercially available ELISA kit (Elabscience Biotechnology, USA).

**Results** There were increased pattern of body weight and blood pressure showed in atherosclerotic models at month 3 onwards compared to control in sham group and reduced significantly with *G. procumbens* supplementation at 250 and 500 mg/kg. GPx and CAT activities were significantly decreased in atherosclerotic groups at month 3 and 6 but increases ( $p < 0.05$ ) with supplementation. ICAM-1 and VCAM-1 were highly expressed in atherosclerotic group, while reduced with *G. procumbens* extract supplementation at 250 and 500 mg/kg body weight.

**Conclusions** *G. procumbens* extract with the dose of 500 mg/kg body weight improves the endothelial function in atherosclerosis might due to increase of the antioxidant enzyme activity.