

**KESAN *IN-VITRO* DAN *IN-VIVO* MADU TUALANG
DAN MADU KELULUT KE ATAS LESI GASTER
ARUHAN *HELICOBACTER PYLORI***

QURAISSIAH BINTI ADAM

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

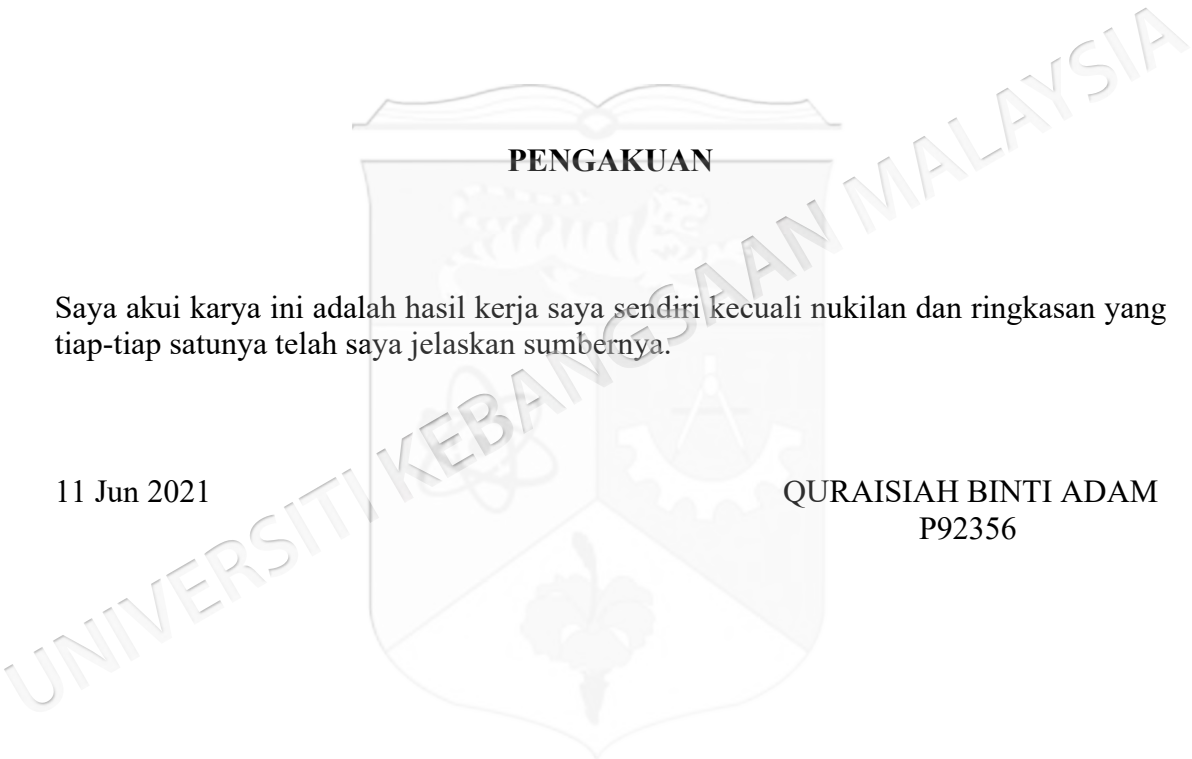
**KESAN *IN-VITRO* DAN *IN-VIVO* MADU TUALANG DAN MADU KELULUT
KE ATAS LESI GASTER ARUHAN *HELICOBACTER PYLORI***

QURAISSIAH BINTI ADAM

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

**FAKULTI PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR**

2021



PENGAKUAN

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

11 Jun 2021

QURAISSIAH BINTI ADAM
P92356

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

Nama Penuh Pengarang
(Author's Full Name) : QURASIAH BINTI ADAM

No. Pendaftaran Pelajar
(Student's Registration No.) : P92356 Sesi Akademik
(Academic Session) : 2017/2018

Tajuk Tesis
(Thesis Title) : KESAN IN-VITRO DAN IN-VIVO MADU TUALANG DAN
MADU KELULUT KE ATAS LESI GASTER ARUHAN
HELICOBACTER PYLORI

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

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

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

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

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

TANDATANGAN PELAJAR
(STUDENT'S SIGNATURE)

DISAHKAN OLEH:
(VERIFIED BY:)

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

920122-12-6448

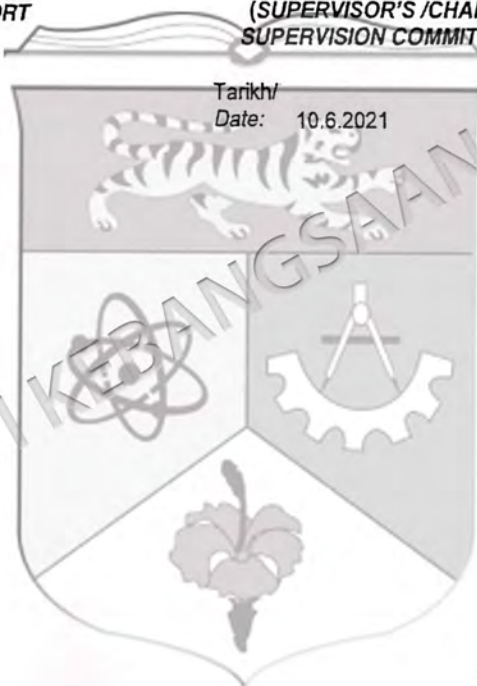
KAD PENGENALAN /
NO. PASPORT
(IDENTITY CARD/PASSPORT
NO.)

PROF. MADYA DR. NUR AZLINA MOHD FAHAMI

NAMA PENYELIA/
PENGURUSI JK SISWAZAH
(SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON
SUPERVISION COMMITTEE NAME)

Tarikh/
Date: 07/06/2021

Tarikh/
Date: 10.6.2021



UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah, Tuhan Yang Maha Pemurah dan Maha Penyayang. Saya panjatkan kesyukuran kehadiran Ilahi kerana dengan limpah kurnia dan izin-Nya, dapat saya menyiapkan kajian ini, Ingin juga saya lahirkan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia utama, Prof. Madya Dr. Nur Azlina Mohd Fahami dan penyelia bersama Prof. Madya Dr. Alfizah Hanafiah untuk segala ilmu, bimbingan, nasihat, serta galakan yang diberikan sepanjang tempoh saya menyiapkan projek ini. Terima kasih juga kepada penyelarar program pascasiswazah, Prof. Madya Dr. Norliza binti Muhamad atas keperihatinan dalam sentiasa memastikan kajian kami, para pelajar pascasiswazah berjalan dengan lancar. Kajian ini juga tidak sempurna tanpa bantuan daripada Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) dan Kementerian Pengajian Tinggi (KPT) di bawah geran FRGS/1/2016/SKK08/ UKM/02/5.

Terima kasih juga kepada semua pensyarah dan kakitangan di Jabatan Farmakologi, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia yang telah membantu saya secara langsung mahupun tidak di sepanjang proses menyiapkan projek sarjana ini. Penghargaan yang tidak terhingga buat En. Mohd Mustazil, En. Fadhullah Zuhair Japar Sidek, En. Azlan, Pn. Juliana Abdul Hamid, Pn. Nur Farhana Mohd Fozi, En. Mohamad dan En. Ok Azuan yang banyak memberi tunjuk ajar, bantuan, komen dan juga pandangan yang bernas. Juga buat rakan-rakan yang banyak membantu sepanjang kajian ini, Fazalda, Syarifah Noratiqah, Siti Zulfarina, Nur Vaizura serta rakan-rakan seperjuangan lain yang banyak memberi dorongan dalam menjayakan kajian ini.

Saya juga ingin melahirkan rasa terima kasih yang tidak terhingga kepada kedua ibu dan adik-beradik saya yang telah banyak memberikan galakan, mendoakan, dan sentiasa memahami serta menyokong saya di waktu susah dan senang. Akhir sekali, penghargaan juga ingin saya berikan kepada semua yang terlibat dalam menyempurnakan kajian ini sama ada secara langsung atau tidak langsung. Segala jasa anda semua tidak akan saya lupakan hingga ke akhir hayat saya. Sekian, terima kasih.

ABSTRAK

Helicobacter pylori (*H. pylori*) adalah sejenis bakteria patogenik yang berkolonisasi dalam perut dan boleh menyebabkan lesi gaster. Madu adalah bahan semulajadi yang telah digunakan sejak zaman dahulu sebagai rawatan melalui kesan antimikrob, antiradang dan antioksidanya. Penyelidikan ini bertujuan untuk mengkaji keberkesanan *in-vitro* dan *in-vivo* madu Tualang dan Kelulut ke atas lesi gaster yang disebabkan oleh jangkitan *H. pylori* berbanding dengan terapi tiga serangkai pada parameter yang terlibat dalam patogenesis lesi gaster. Ujian suseptibiliti antimikrob (AST) *in-vitro* ke atas madu Tualang dan madu Kelulut telah dilakukan terhadap *H. pylori* pada kepekatan yang berbeza menggunakan kaedah 'Agar well diffusion'. Hasil kajian menunjukkan madu Tualang dan madu Kelulut mempunyai pelbagai aras aktiviti antibakteria kerana mempunyai purata diameter zon perencatan yang berbeza-beza dari 6.36 mm hingga 15.14 mm. Madu Tualang mempunyai zon perencatan tertinggi (15.14 ± 0.86 mm) pada kepekatan 75% dan tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) berbanding Clarithromycin (27 mm), yang merupakan kawalan positif. Untuk kajian *in-vivo*; tikus jantan Sprague-Dawley ($n=45$) dibahagikan secara rawak kepada lima kumpulan ($n=9$) yang terdiri daripada (i) Kawalan normal; (ii) Kawalan negatif (inokulasi *H. pylori*); (iii) Kawalan positif (terapi tiga serangkai); (iv) Madu Tualang; dan (v) Madu Kelulut. Semua kumpulan kecuali kawalan normal, telah diinokulat dengan *H. pylori* dua kali sehari selama tujuh hari berturut-turut. Selepas inkubasi selama empat minggu, tiga kumpulan rawatan (kawalan positif terapi tiga serangkai yang merangkumi Omeprazole (2.04 mg/kg), Amoxicillin (102.80 mg/kg) dan Clarithromycin (51.37 mg/kg); madu Tualang (2.0 g/kg); dan madu Kelulut (2.0 g/kg) pada setiap berat badan tikus) dirawat dua kali sehari selama 14 hari. Kajian makroskopik menunjukkan lesi atau hakisan yang tidak jelas, namun kajian histologi dengan pewarnaan Giemsa menunjukkan kolonisasi *H. pylori* di kelenjar mukosa antrum gaster pada kumpulan kawalan negatif. Tambahan pula, dengan pewarnaan H&E, kerosakan yang signifikan ($p < 0.05$) adalah meluas pada mukosa gaster yang disebabkan oleh *H. pylori* pada kumpulan kawalan negatif berbanding kumpulan kawalan normal. Walaubagaimanapun, rawatan madu Kelulut menunjukkan perbaikan yang signifikan ($p < 0.05$) kepada histologi mukosa gaster berbanding rawatan kumpulan madu Tualang dan kawalan positif. Peningkatan ke atas keasidan rembesan gaster, perantara keradangan (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , iNOS, NO dan VEGF) dan perantara bukan enzim MDA telah dihalang dengan signifikan ($p < 0.05$) oleh rawatan madu Tualang. Madu Tualang juga dapat menghalang pengurangan enzim antioksidasi (SOD dan GPx) dengan signifikan ($p < 0.05$) setelah induksi *H. pylori*. Manakala, madu Kelulut pula dengan signifikan ($p < 0.05$) telah menghalang peningkatan keasidan rembesan gaster, perantara keradangan (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , iNOS, NO dan VEGF) dan perantara bukan enzim MDA. Ia juga menghalang pengurangan enzim antioksidasi (SOD, CAT, dan GPx) dengan signifikan ($p < 0.05$) setelah induksi *H. pylori*. Maka, rawatan madu Tualang dan Kelulut didapati setanding dengan rawatan terapi tiga serangkai dalam menghalang peningkatan ke atas keasidan rembesan gaster, perantara keradangan (IL-1 β , TNF- α dan IFN- γ) dan perantara bukan enzim MDA. Penemuan ini menunjukkan bahawa rawatan madu Tualang dan Kelulut berpotensi memberi kesan antibakteria, antiradang, dan aktiviti antioksidasi sebagai rawatan lesi gaster akibat jangkitan *H. pylori*.

IN-VITRO AND IN-VIVO EFFECT OF TUALANG AND KELULUT HONEY ON *HELICOBACTER PYLORI* INDUCED GASTRIC LESIONS

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is one of the pathogenic bacteria that colonise the stomach that can cause gastric lesion. Honey is a natural substance used since ancient times as medication for its antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant effects. This research aimed to examine the *in-vitro* and *in-vivo* efficacy of Tualang and Kelulut honey in *H. pylori*-induced gastric lesions relative to triple therapy for parameters involved in the pathogenesis of gastric lesions. Antimicrobial susceptibility testing (AST) of Tualang and Kelulut honey toward *H. pylori* was performed *in-vitro* at a different concentration using Agar well diffusion method. The findings showed that the Tualang and Kelulut honey revealed various anti-bacterial activity levels with a mean inhibition zone diameter of 6.36 mm to 15.14 mm. Tualang honey had the highest inhibition zone (15.14 ± 0.86 mm) at 75% concentration and was not significantly different ($p > 0.05$) from Clarithromycin (27 mm), the positive control. In the *in-vivo* study; adult male Sprague-Dawley rats ($n=45$) were randomly divided into five groups ($n=9$) comprising (i) Normal Control; (ii) Negative Control (*H. pylori* inoculation); (iii) Positive Control (Triple Therapy); (iv) Tualang Honey; and (v) Kelulut Honey. *H. pylori* were inoculated in all groups except the normal control twice daily for seven consecutive days. After four weeks of incubation, three treatment groups (Positive control triple therapy of Omeprazole (2.035 mg/kg), Amoxicillin (102.80 mg/kg), Clarithromycin (51.37 mg/kg); Tualang honey (2.0 g/kg), and Kelulut honey (2.0 g/kg) at a bodyweight of each rat) were treated twice daily for 14 days. Macroscopic finding shows unclear lesions or erosions, but histological findings with Giemsa staining showed colonisation of *H. pylori* in the gastric antrum mucosal glands in the negative control group. In addition, H&E staining reveals significant ($p < 0.05$) damage to the gastric mucosa caused by *H. pylori* in negative control group relative to normal control group. However, treatment with Kelulut honey caused a significant ($p < 0.05$) improvement to the gastric mucosa compared to the Tualang honey and positive control groups. The increase in gastric total acidity, inflammatory mediators (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , iNOS, NO and VEGF) and non-enzymatic mediator of MDA were significantly inhibited by Tualang honey treatment. Tualang honey also prevented the reduction of antioxidant enzyme (SOD and GPx) significantly ($p < 0.05$) following *H. pylori* induction. Whereas Kelulut honey significantly ($p < 0.05$) inhibited the increase in the total gastric acidity, inflammatory mediators (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , iNOS, NO and VEGF) and non-enzymatic mediator of MDA and significantly ($p < 0.05$) prevented enzymatic reduction of (SOD, CAT, and GPX) following *H. pylori* induction. Thus, the treatment of Tualang and Kelulut honey were comparable to the triple therapy treatment in the prevention of increased gastric total acidity, inflammatory mediators (IL-1 β , TNF- α and IFN- γ) and non-enzymatic mediator of MDA. These findings suggested that Tualang and Kelulut honey treatment has potential antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant activities on *H. pylori*-induced gastric lesions.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI FOTOMIKROGRAF	xiv
SENARAI SINGKAT DAN SIMBOL	xv
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif Kajian	
1.2.1 Objektif umum	4
1.2.2 Objektif khusus	4
1.3 Hipotesis Kajian	5
1.4 Kepentingan Kajian	6
 BAB II KAJIAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Penyakit Ulser Peptik	7
2.1.1 Histologi gaster dan penyakit ulser peptik	8
2.2 <i>Helicobacter pylori</i>	11
2.3 Patogenesis Jangkitan <i>H. pylori</i>	12
2.3.1 Faktor virulens <i>H. pylori</i>	13
2.3.2 Tindakbalas hos terhadap <i>H. pylori</i>	14
2.3.3 Imunomodulasi oleh <i>H. pylori</i>	17
2.3.4 Pencegahan tindakbalas imun oleh <i>H. pylori</i>	19
2.3.5 Penghasilan tekanan oksidatif (tindakbalas hos)	19
2.4 Rawatan Terhadap Jangkitan <i>H.pylori</i>	21
2.5 Madu Dalam Bidang Perubatan	23
2.5.1 Kesan antibakteria aktiviti pada madu	25
2.5.2 Kesan antioksidan aktiviti pada madu	25
2.5.3 Kesan antiradang aktiviti pada madu	27

2.6	Madu Tualang	27
2.6.1	Komposisi dan sifat-sifat fisikokimia madu Tualang	28
2.7	Madu Kelulut	29
2.7.1	Komposisi dan sifat-sifat fisikokimia madu Kelulut	29
BAB III KAEDAH KAJIAN		
3.1	Bahan	31
3.1.1	Haiwan kajian	31
3.1.2	Bahan kimia	31
3.1.3	Alat radas	33
3.2	Pengendalian Tikus Dan Penyediaan Diet	35
3.2.1	Pengendalian tikus	35
3.3	Penyediaan Rawatan	36
3.3.1	Madu Tualang dan madu Kelulut	36
3.3.2	Terapi piawai tiga serangkai	36
3.4	Penyediaan Ejen Anestetik	37
3.5	Persampelan Darah Tikus	38
3.6	Pengorbanan Haiwan Kajian	38
3.7	Reka Bentuk Kajian	38
3.7.1	Kultur bakteria <i>H. pylori</i>	38
3.7.2	Kajian <i>in-vitro</i>	38
3.7.3	Kajian <i>in-vivo</i>	39
3.8	Pengukuran Parameter Fizikal	40
3.8.1	Pengambilan diet	40
3.8.2	Berat badan	40
3.9	Penentuan Parameter Kajian	42
3.9.1	Pengukuran asid gaster	42
3.9.2	Aras enzim katalase (CAT) pada tisu gaster	42
3.9.3	Aras enzim superoksida dismutase (SOD) pada tisu gaster	42
3.9.4	Aras enzim glutathione peroksidase (GPX) pada tisu gaster	43
3.9.5	Aras enzim pemperoksidaan lipid, melondialdehid (MDA) pada tisu gaster	43
3.9.6	Aras enzim nitrik oksida (NO) dan nitrik oksida sintase teraruh (iNOS) pada tisu gaster	43
3.9.7	Aras sitokin IL-1b, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p, TNF- α , IFN- γ , dan VEGF pada tisu gaster	44

3.10	Pemprosesan Tisu Gaster dan Pewarnaan Hematoksilin & Eosin dan Giemsa	45
3.10.1	Pemprosesan tisu gaster	45
3.10.2	Pewarnaan hematoksilin dan eosin	47
3.10.3	Skor ekspresi lesi mukosa gaster	50
3.10.4	Pewarnaan giemsa	51
3.11	Analisis Statistik	51

BAB IV HASIL KAJIAN

4.1	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Sebagai Anti- <i>H. pylori</i> Aktiviti Pada Ujian Suseptibiliti Antimikrob (AST)	53
4.2	Kajian Mikroskopik Tisu Gaster: Pewarnaan Giemsa	54
4.3	Kajian Mikroskopik Tisu Gaster: Pewarnaan H&E	55
4.4	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Kepekatan Asid Gaster Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	59
4.5	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Malondialdehid (MDA) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	60
4.6	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Katalase (CAT) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	61
4.7	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Superoxide Dismutase (SOD) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	62
4.8	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Glutation Peroksidase (GPx) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	63
4.9	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Interleukin-1 β (IL-1 β) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	64
4.10	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Interleukin-6 (IL-6) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	65
4.11	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Interleukin -12p70 (IL-12p70) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	66
4.12	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Faktor Nekrosis Tumor- α (TNF- α) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	67
4.13	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Interferon- γ (IFN- γ) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	68
4.14	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Interleukin-4 (IL-4) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	69
4.15	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Interleukin-10 (IL-10) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	70
4.16	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Pengekspresan Gen iNOS dan Kandungan NO Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	71

4.17	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Faktor VEGF Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	73
------	---	----

BAB V PERBINCANGAN

5.1	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Sebagai Anti- <i>H. pylori</i> Aktiviti Pada Ujian Suseptibiliti Antimikrob (AST)	74
5.2	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Struktur Histologi Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	77
5.3	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Kepekatan Asid Gaster Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	79
5.4	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Malondialdehid (MDA) Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	82
5.5	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Aktiviti-Aktiviti Tekanan Oksidatif CAT, SOD dan GPx Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	85
5.6	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Ekspresi Gen iNOS dan Kandungan NO Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	88
5.7	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Kandungan Protein Sitokin Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	90
5.7.1	Kesan madu Tualang dan madu Kelulut ke atas pro-keradangan interleukin (IL-1 β , IL-6, IL-12), tumor faktor nekrosis (TNF- α) dan interferon- γ (IFN- γ) dalam lesi gaster aruhan <i>H. Pylori</i>	91
5.7.2	Kesan madu Tualang dan madu Kelulut ke atas antiradang interleukin (IL-4 dan IL-10) dalam lesi gaster aruhan <i>H. Pylori</i>	94
5.8	Kesan Madu Tualang dan Madu Kelulut Ke Atas Faktor VEGF Dalam Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	96
5.9	Perbincangan Keseluruhan Ke Atas Rawatan Madu Tualang dan Kelulut Ke Atas Lesi Gaster Aruhan <i>H. pylori</i>	98

BAB VI KESIMPULAN

6.1	Kesimpulan	104
6.2	Limitasi Kajian	106
6.3	Cadangan Kajian	107

RUJUKAN	108
----------------	-----

LAMPIRAN

Lampiran A	Sijil Kelulusan Etika Penggunaan Haiwan Daripada UKMAEC	147
------------	---	-----

Lampiran B	Prosedur Kit Bagi Penentuan MDA	148
Lampiran C	Prosedur Kit Bagi Penentuan CAT	149
Lampiran D	Prosedur Kit Bagi Penentuan SOD	150
Lampiran E	Prosedur Kit Bagi Penentuan GPx	152
Lampiran F	Prosedur Kit Bagi Penentuan Protein Sitokin	153
Lampiran G	Penyertaan Persidangan	154
Lampiran H	Pembuktian Penerbitan I	156
Lampiran I	Pembuktian Penerbitan II	157
Lampiran J	Pembuktian Penerbitan III	160



SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
Jadual 3.1	Kepekatan larutan piawai natrium nitrit	44
Jadual 3.2	Aras kronik keradangan, aktiviti, dan perubahan atrofik pada mukosa gaster	50
Jadual 4.1	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) sebagai anti- <i>H. pylori</i> pada ujian suseptibiliti antimikrobial (AST)	53
Jadual 4.2	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas mukosa gaster pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	55



SENARAI RAJAH

No. Rajah		Halaman
Rajah 2.1	Faktor-faktor yang menyumbang kepada penyakit ulser peptik (PUD)	8
Rajah 2.2	Histologi normal gaster	10
Rajah 2.3	Histologi kronik ulser peptik	10
Rajah 2.4	Patogenesis dan tindakbalas <i>H. pylori</i>	21
Rajah 2.5	Struktur kimia flavonoid, asid organik, dan bahan-bahan fenolik yang terdapat dalam madu	24
Rajah 2.6	Pokok Tualang (<i>Kompassia excelsa</i>)	28
Rajah 2.7	Sarang lebah tidak bersengat (<i>Trigona</i> atau <i>Meliponine</i>)	29
Rajah 3.1	Reka bentuk kajian <i>in-vitro</i>	39
Rajah 3.2	Reka bentuk kajian <i>in-vivo</i>	41
Rajah 3.3	Carta alir kaedah pemprosesan tisu gaster dan penyediaan slaid histologi	47
Rajah 3.4	Carta alir pewarnaan histologi H&E	49
Rajah 3.5	Carta alir pewarnaan histologi Giemsa	52
Rajah 4.1	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas kepekatan asid gaster pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	59
Rajah 4.2	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas MDA pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	60
Rajah 4.3	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas enzim CAT pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	61

Rajah 4.4	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas enzim SOD pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	62
Rajah 4.5	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas enzim GPX pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	63
Rajah 4.6	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IL-1 β pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	64
Rajah 4.7	Kesan madu Tualang (TH) dan madu Kelulut (KH) ke atas sitokin IL-6 pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	65
Rajah 4.8	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IL-12p70 pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	66
Rajah 4.9	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin TNF- α pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	67
Rajah 4.10	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IFN- γ pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	68
Rajah 4.11	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IL-4 pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	69
Rajah 4.12	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IL-10 pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	70
Rajah 4.13	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas ekspresi mRNA nitrik oksida sintase teraruh (iNOS) pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	72
Rajah 4.14	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas kandungan NO pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	72
Rajah 4.15	Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin VEGF pada tikus lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	73
Rajah 5.1	Ringkasan kesan-kesan madu Tualang dan madu Kelulut yang terlibat dalam pembentukan lesi gaster aruhan <i>H. pylori</i>	102

SENARAI FOTOMIKROGRAF

No. Fotomikrograf		Halaman
Fotomikrograf 4.1	Pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan Giemsa bagi kumpulan (G1) Kawalan Normal; (G2) Kawalan Negatif, 100x (10µm)	54
Fotomikrograf 4.2	Pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan H&E dari kumpulan (G1) Kawalan Normal; (G2) Kawalan Negatif; (G3) Rawatan Terapi Tiga Serangkai (TT); (G4) Rawatan Madu Tualang (MT); (G5) Rawatan Madu Kelulut (MK), 10x (100µm)	56
Fotomikrograf 4.3	Pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan H&E dari kumpulan (G1) Kawalan Normal; (G2) Kawalan Negatif; (G3) Rawatan Terapi Tiga Serangkai (TT); (G4) Rawatan Madu Tualang (MT); (G5) Rawatan Madu Kelulut (MK), 20x (50µm)	57
Fotomikrograf 4.4	Pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan H&E dari kumpulan (G1) Kawalan Normal; (G2) Kawalan Negatif; (G3) Rawatan Terapi Tiga Serangkai (TT); (G4) Rawatan Madu Tualang (MT); (G5) Rawatan Madu Kelulut (MK), 40x (20µm)	58

SENARAI SINGKAT DAN SIMBOL

°C	Darjah celsius
ACG	Kolej Gastroenterologi Amerika
AED	Dos setara haiwan
AGS	Titisan sel adenokarsinoma gaster
APCs	Sel penyaji antigen
AST	Ujian suseptibiliti antimikrob
B-sel	Limfosit B
BSA	Luas berat piawai manusia
<i>cag A</i>	Sitotoksin berkaitan gen A
<i>cag-PAI</i>	Pepulau kepatogenan
CAT	Katalase
CBA	<i>Columbia blood agar</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
cGMP	Guanosin monofosfat siklik
CO ²	Karbon dioksida
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
DCs	Sel dendritik
dHL-60	<i>Differentiated human leukemia-60</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPX	<i>Dibutylphthalate polystyrene xylene</i>
EGFR	Reseptor faktor pertumbuhan epidermal
FAMA	Lembaga Pemasaran Pertanian Persekutuan
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gram
GI	Gastrousus
GPx	Glutation peroksidase
GSH	Glutation
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H&E	Hematoksilin dan eosin
H ⁺	Ion hydrogen

H ⁺ -K ⁺ -ATPase	<i>Hydrogen potassium adenosine triphosphatase</i>
H ₂ O ₂	Hydrogen peroksida
H ₂ RA	Antagonis reseptor histamin H ₂
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HcpA	<i>Helicobacter cysteine-rich protein A</i>
HSP	Protein kejutan haba (<i>heat shock proteins</i>)
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	<i>Immunoglobulin</i>
IL	Interleukin
iNOS	Nitrik oksida sintase teraruh
ion H ⁺	Ion hidroksil
ITP	Idiopatik thrombositopenia
IVC	<i>Individually ventilated cage</i>
IκBα	Perencat kappa B
kg	Kilogram
KN	Kawalan normal
LPS	Lipopolisakarida
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDA	Malondialdehid
MGO	<i>Methylglyoxal</i>
MHB	<i>Mueller hinton broth</i>
MHBA	<i>Mueller hinton blood agar</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MK	Madu Kelulut
ml	Mililiter
mm	Milimeter
MM6	Mono Mac 6
MT	Madu Tualang
NADPH	Fosfat nikotinamide adenine dinukleotida
NaNO ₂	Natrium nitrit (<i>sodium nitrate</i>)
NaOH	Natrium hidroksida
NF-κB	Nuklear faktor kappa B
NH ₂ Cl	Klorimina

NH ₃	Ammonia
NK	Pembunuh semulajadi
nm	Nanometer
NO	Nitrik oksida
NO ₂ ⁻	Nitrit
NOS	Nitrik oksida sintase
NSAID	Ubat antiradang bukan steroid
O ₂ ⁻	Anion superoksida
OCl ⁻	Hipoklorit
OH	Radikal hidroksil
ORFs	Kerangka bacaan terbuka
PDGF	Faktor pertumbuhan yang diperolehi platelet
PG	Prostaglandin
pH	<i>Potential of hydrogen</i>
PPI	Perencat pam proton
PPU	Ulser peptik tembus
PRM	Pengecaman molekul patogen
PUD	Penyakit ulser peptik
RH	Kelembapan relatif
RNS	Spesies nitrogen reaktif
<i>rocF</i>	<i>Rey-osterrieth complex figure</i>
ROS	Spesies oksigen reaktif
S.A.W	Sallallahu Alaihi Wasallam
SD	Sisihan piawai
SEM	Ralat piawai
SOD	Superoksida dismutase
T-sel	Limfosit T
T4SS	Sistem rembesan jenis IV
TGF-β	Transformasi faktor pertumbuhan-β
Th1	<i>T helper type 1</i>
Th2	<i>T helper type 2</i>
TLRs	Tol-seperti reseptor
TNF-α	Faktor nekrosis tumor-α

Tr1	Regulatori T 1
Treg	Regulatori T
TT	Terapi tiga serangkai (<i>triple therapy</i>)
UKM	Universiti Kebangsaan Malaysia
UKMAEC	Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia
<i>vac A</i>	Vakuol sitotoksin
VEGF	Faktor pertumbuhan vaskular endotelium
μL	Mikroliter
μM	Mikrometer



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Penyakit ulser peptik (PUD) terjadi disebabkan oleh gangguan mukosa gastrousus (GI). Pembentukannya adalah disebabkan oleh kehilangan faktor pelindung dan/atau kerosakan yang menyebabkan hakisan mukosa yang pada lazimnya paling banyak terjadi di bahagian gaster atau duodenum (Eichenseher 2018). Mengikut kajian sejarah lama, para penyelidik mendapati bahawa tabiat merokok, stres, pengambilan ubat antiradang bukan steroid (NSAID) dan individu yang mempunyai latarbelakang keluarga berisiko tinggi menyumbang kepada pembentukan ulser peptik. Perubatan alopati digunakan dalam merawat PUD sebelum akhir 1970-an. Walau bagaimanapun, kedatangan dua perkembangan revolusi menyebabkan keberkesanan perubatan alopati menjadi terbatas, iaitu penciptaan farmaseutikal yang dapat mengurangkan asid gaster yang dihasilkan dan penemuan bakteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Eichenseher 2018; Rotter 1983). Pada tahun 1982, John Robin Warren dan Barry James Marshall yang merupakan saintis Australia telah menemukan bakteria *H. pylori* di dalam gaster (Marshall & Warren 1983), yang membawa kepada penerimaan *Nobel Prize* dalam perubatan pada tahun 2005. Mereka melaporkan bahawa kejadian ulser gaster dan gastritis adalah disebabkan oleh jangkitan bakteria *H. pylori* (Marshall & Warren 1984).

Jangkitan oleh bakteria *H. pylori* menunjukkan peningkatan kejadian PUD sekurang-kurangnya 4 kali ganda (Kuipers et al. 1995) dan 1.75 kali ganda dilaporkan oleh Schöttker et al. (2012). Bakteria *H. pylori* hidup di persekitaran berasid dalam perut

manusia, di mana ia meningkatkan risiko PUD dengan secara langsung merosakkan pelindung lapisan lendir saluran GI dan menyebabkan peningkatan keadaan berasid yang merosakkan. Bacteria *H. pylori* juga menyebabkan pengeluaran tindakbalas imun yang menyebabkan keradangan berlaku. Selain penyakit PUD, *H. pylori* juga dikaitkan dengan peningkatan kadar risiko kanser gaster, atrofi usus metaplasia mukosa gaster, dispepsia, kekurangan vitamin B12, kekurangan zat besi, dan thrombositopenia idiopatik (ITP) (Goh et al. 2007; Malnick et al. 2014; Schöttker et al. 2012). Walaupun prevalens jangkitan *H. pylori* telah berkurangan, bakteria ini masih lagi menjangkiti 30% ke 50% daripada penduduk dunia (Hooi et al. 2017; Zamani et al. 2018). Di samping itu, pesakit yang mempunyai penyakit gastroduodenum teruk akan mempunyai kadar jangkitan *H. pylori* yang tinggi (Alfizah et al. 2010).

Penghapusan jangkitan *H. pylori* yang berkesan dapat menyembuhkan ulser dan menghalang kejadian ulser peptik dan seterusnya dapat mengurangkan berlakunya kanser gaster di kalangan penduduk yang berisiko tinggi (Ndip et al. 2008; Tang et al. 2012). Penghasilan ubat perencat asid oleh farmaseutikal, penemuan dan rawatan antibiotik terhadap *H. pylori*, menyebabkan PUD hampir disingkirkan pada akhir abad ke-20. Regimen pertama untuk merawat *H. pylori* adalah terapi tiga serangkai (*triple therapy*), yang terdiri daripada dua kombinasi antibiotik piawai (Amoxicillin dan Clarithromycin atau Metronidazole) dan perencat proton pam (PPI) (Chey et al. 2017; Malfertheiner et al. 2002). Walau bagaimanapun, disebabkan oleh peningkatan kerintangan antibiotik, peningkatan pengetahuan tentang kemudahan pengambilan ubat perencat asid (antagonis reseptor histamin H2 (H2RA) dan PPI) pada jangka masa yang panjang, memerlukan kegunaan antibiotik yang lebih praktikal. Keperluan ini telah membawa kepada penilaian semula penggunaan terapeutik ubat-ubatan purba, seperti tumbuh-tumbuhan dan produk berasaskan tumbuhan, termasuk madu (Eichenseher 2018; Mandal & Mandal 2011; Mandal et al. 2010).

Madu, debunga dan propolis adalah produk lebah yang telah dilaporkan berkesan dalam perubatan tradisional sejak zaman dahulu (Sahin 2016). Madu mempunyai komponen fruktosa dan glukosa (80-85%); air (15-17%), abu (0.2%), protein dan asid amino (0.1-0.4%) dan sedikit enzim, vitamin dan bahan lain, seperti komponen fenolik (Patricia et al. 2015). Walaubagaimanapun, komposisi madu adalah

berbeza-beza berdasarkan jenis pokok di mana lebah mendapatkan nektar. Hampir kesemua madu mempunyai jenis asid fenolik yang serupa (kafeik, elagik, ferulit dan p-kumarit), flavonoid (apigenin, krisin, ‘galangin’, ‘heperetin’, kaempferol, ‘pinocembrin’ dan kuersetin) dan antioksidan, (tokoferol, asid askorbik, superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan ‘reduced glutathione’ (GSH)) (Patricia et al. 2015). Madu telah dilaporkan mempunyai banyak manfaat kesihatan yang fungsi sebagai antibakteria, antioksidan, antiradang, penyembuhan luka serta makanan tambahan yang sangat baik untuk meningkatkan tenaga dan mengoptimumkan imuniti manusia yang telah terbukti secara saintifik (Sarfarz Ahmed et al. 2018; Almasaudi et al. 2016; P. Molan 2009; Nasir et al. 2010; Saba et al. 2013). Khasiat madu terbukti berkesan dapat mengatasi pelbagai jenis jangkitan mikroorganisma seperti jangkitan bakteria gram positif dan negatif, bakteria aerobik dan anaerobik (Kim et al. 2017; Zainol et al. 2013). Selain itu, terdapat banyak kajian tentang madu yang menunjukkan keberkesanannya menentang jangkitan *H. pylori* di dalam kajian *in-vitro* dan *in-vivo* (Amaral et al. 2017; Kim et al. 2017; Manyi-Loh et al. 2010). Madu juga mampu menggalakkan pembaikan mukosa usus yang rosak, merangsang pertumbuhan tisu baru dan bertindak sebagai agen antiradang (Devasvaran & Yong 2016; Kassim, Achoui, Mansor, et al. 2010). Kapasiti antioksidan madu disebabkan oleh kewujudan kandungan polifenol seperti flavonoid dan asid fenolik yang bertindak sebagai penghapus-sisa radikal bebas, penghapus-sisa peroksi-radikal dan sebagai pengkelat logam (Juszczak et al. 2016; Kishore et al. 2011).

Di Malaysia, terdapat beberapa jenis madu yang boleh diperolehi. Madu Tualang dan madu Kelulut adalah antara jenis madu yang popular. Tualang ialah madu yang dihasilkan oleh lebah Tualang (*Apis dorsata*) yang terdapat di hutan hujan tropika Malaysia (Sarfarz Ahmed & Othman 2013). Madu Tualang mempunyai penampilan warna coklat gelap. Madu Tualang dilaporkan mempunyai aktiviti antimikrob dan penyembuhan luka. Madu Tualang juga dilaporkan mempunyai aktiviti antibakteria, antioksidan, antiradang serta sifat penyembuhan luka (Bashkaran et al. 2011; Devasvaran & Yong 2016; Ibrahim Khalil et al. 2012; Mohamed & Hamad Alfarisi 2017; Mohd-Aspar et al. 2019; Nasir et al. 2010; Shehu et al. 2015). Sementara itu, madu Kelulut dihasilkan oleh lebah tidak bersengat. Lebah tidak bersengat ialah lebah kecil daripada spesis *Trigona*, mempunyai kelebihan kandungan yang tinggi dalam

perubatan lebih daripada spesis lebah yang lain seperti didakwa oleh pengamal perubatan tradisional. Lebah ini merupakan pendebunga yang utama dalam kalangan lebah yang lain dan boleh ditemui di kebanyakan kawasan tropika dan subtropika (Fowler 1979; Yaacob et al. 2017). Madu Kelulut mempunyai warna madu yang berbeza mengikut nectar, dari jernih sehingga ke gelap pekat dan mempunyai rasa yang manis dan masam (Assegid et al. 2003; Roowi et al. 2012). Madu kelulut telah terbukti memiliki pelbagai sifat farmakologi seperti antiradang, antibakteria, anti-penuaan, anti-ulser, penyembuhan luka dan sifat antioksidan (Al-Hatamleh et al. 2020; Nordin et al. 2017; Yazan et al. 2018; Zainol et al. 2013). Walaubagaimanapun, disebabkan kekurangan kajian tentang madu Tualang dan Kelulut melawan jangkitan *H. pylori*, keberkesanan madu tersebut tidak dapat dibuktikan. Oleh itu, hasil kajian ini akan menjadi sangat berbaloi untuk mengkaji dan membuktikan kesan aktiviti antibakteria, antiradang, dan antioksidan madu Tualang dan madu Kelulut terhadap jangkitan *H. pylori* untuk dijadikan bukti awal dengan memastikan keberkesannya sebelum beralih kepada kajian klinikal.

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

1.2.1 Objektif Umum

Untuk menentukan dan membandingkan kesan madu Tualang dan madu Kelulut ke atas ulser gaster yang disebabkan oleh jangkitan *H. pylori*.

1.2.2 Objektif Khusus

- i. Mengkaji kesan anti-*H. pylori* madu Tualang dan madu Kelulut pada kepekatan yang berbeza pada ujian *in-vitro*.
- ii. Mengkaji kesan madu Tualang dan Kelulut ke atas keasidan gaster pada tikus yang dijangkiti *H. pylori*.

- iii. Menentukan kesan madu Tualang dan Kelulut ke atas peroksidasi lipid (MDA), perubahan pada enzim antioksidan (CAT, SOD, GPX) dan nitrik oksida (NO) dalam tisu gaster tikus yang dijangkiti *H. pylori*.
- iv. Menentukan mekanisme perlindungan madu Tualang dan Kelulut melalui pengawal-aturan protein sitokin (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ) dan faktor pertumbuhan gaster VEGF dalam tisu gaster tikus yang dijangkiti *H. pylori*.
- v. Membandingkan kesan madu Tualang dan Kelulut dengan terapi tiga serangkai ke atas semua parameter kajian dalam rawatan ulser gaster yang disebabkan oleh jangkitan *H. pylori*.

1.3 HIPOTESIS KAJIAN

- i. Madu Tualang dan Kelulut mempunyai potensi memberi kesan anti-*H. pylori* pada kepekatan yang berbeza dalam ujian *in-vitro*.
- ii. Madu Tualang dan Kelulut melindungi gaster akibat perubahan keasidan gaster pada tikus yang dijangkiti *H. pylori*.
- iii. Madu Tualang dan Kelulut melindungi gaster dengan mengurangkan peroksidasi lipid (MDA), menghalang perubahan pada enzim antioksidan (CAT, SOD, GPX) dan nitrik oksida (NO) dalam tisu gaster tikus yang dijangkiti *H. pylori*.
- vi. Madu Tualang dan Kelulut melindungi gaster dengan mengawal-atur protein sitokin (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ) dan faktor pertumbuhan gaster VEGF dalam tisu gaster tikus yang dijangkiti *H. pylori*.
- iv. Madu Tualang dan Kelulut adalah lebih baik daripada terapi tiga serangkai ke atas semua parameter kajian dalam rawatan ulser gaster yang disebabkan oleh jangkitan *H. pylori*.

1.4 KEPENTINGAN KAJIAN

Diharapkan agar kajian ini membuktikan dan menjelaskan secara molekular kesan madu Tualang dan madu Kelulut dari Malaysia yang kaya dengan sifat antibakteria, antioksidan dan antiradang yang semulajadi yang berupaya melindungi gaster dari pembentukan lesi gaster aruhan *H. pylori*. Hasil kajian ini juga dapat menjelaskan mekanisme bagaimana madu Tualang dan madu Kelulut bertindak dalam menghasilkan kesan perlindungan lesi gaster. Kaedah pengkajian molecular dalam kajian ini juga mampu memberikan perincian terhadap mekanisme cara tindak madu Tualang dan madu Kelulut dalam menghalang pembentukan lesi gaster aruhan *H. pylori*. Ini akan membantu proses pengenalpastian sasaran molekular dalam profilaksis lesi gaster.



BAB II

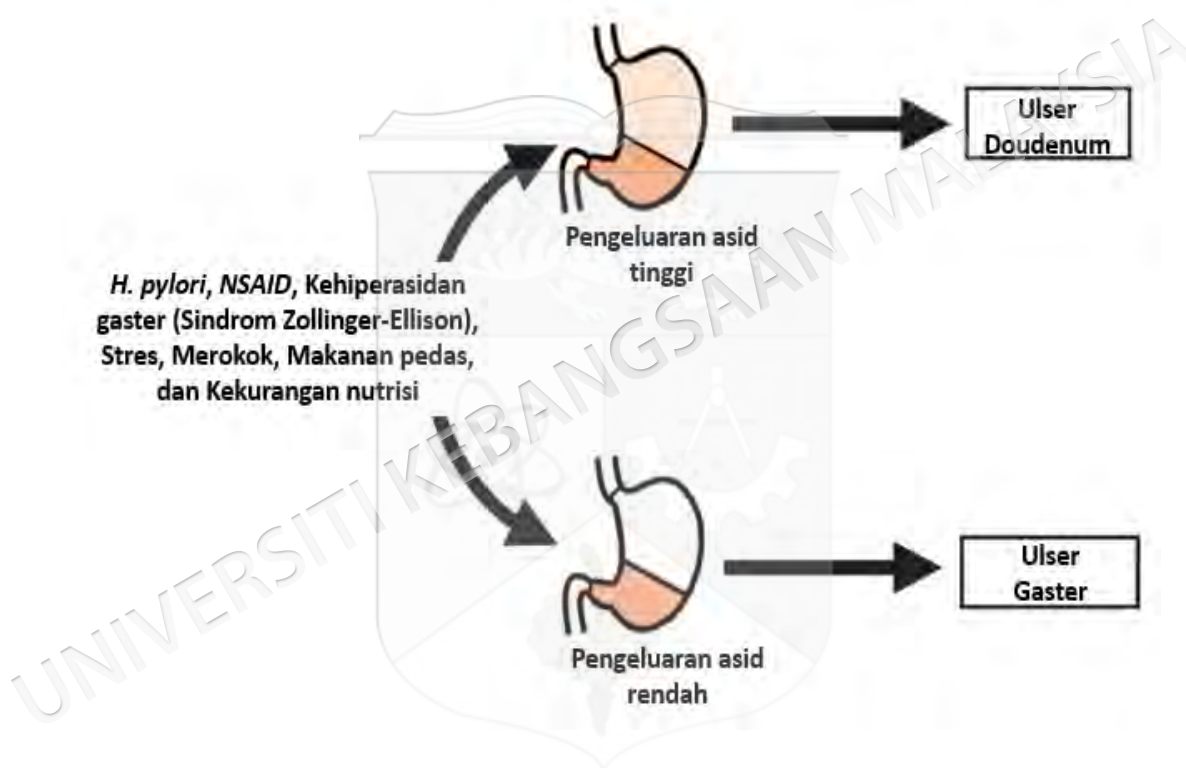
KAJIAN PERPUSTAKAAN

2.1 PENYAKIT ULSER PEPTIK

Penyakit ulser peptik (PUD) ialah penyakit yang disebabkan oleh penghakisan lapisan di dalam gaster atau duodenum sehingga ke mukosa muskularis. Lapisan gaster ini mengandungi sel yang mengeluarkan rembesan asid gaster dan mukus di mana ia melindungi sel perut daripada rembesan gaster (Amandeep et al. 2012; Kaushik et al. 2011). PUD terjadi kerana ketidakseimbangan atau variasi di antara faktor agresif dan faktor pertahanan. Faktor agresif adalah seperti pepsin, hempedu refleksif, leukotrien, spesies oksigen reaktif, manakala faktor pertahanan pula adalah seperti mukus, prostaglandin, nitrik oksida, rembesan bikarbonat, kerintangan semula jadi mukosa, aliran darah mukosa, antioksidan tanpa enzim dan beberapa faktor pertumbuhan (Jianyuan Chai 2011). PUD memberi kesan kepada 4 juta orang di seluruh dunia. 10-20 % daripada pesakit akan menerima komplikasi PUD termasuk pendarahan, perforasi dan saluran gaster yang tersumbat (Fashner & Gitu 2015). Wanita sering mendapat penyakit ulser peptik dibandingkan dengan lelaki (Goud 2017). Satu kajian pada tahun 2014 melaporkan bahawa sebanyak 53 juta orang didiagnosis penyakit PUD dan sekurang-kurangnya 10 % orang dari seluruh dunia menderita penyakit PUD (Roy 2016). Terdapat 327,000 kematian pada 1990 disebabkan oleh PUD dan ia menurun kepada 301,000 kematian pada tahun 2013 (Roy 2016).

PUD terdiri daripada dua jenis utama iaitu (i) ulser gaster (ii) ulser duodenum. Ulser gaster didefinisikan sebagai hakisan normal mukosa gaster di submukosa atau lebih dalam. Sebaliknya, ulser duodenum ialah ulser yang wujud dalam duodenum atau

bagagian pertama usus. Dalam keadaan ulser gaster, rembesan asid akan menjadi sedikit atau normal tetapi pada ulser duodenum, rembesan asid akan tinggi sebanyak 50 % pada kebanyakan pesakit PUD. Antara penyebab utama ulser peptik adalah jangkitan *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), pengambilan *NSAID* (ubat antiradang bukan steroid), peningkatan rembesan asid gastrik dan sebab-sebab yang lain seperti stres, merokok, makan makanan pedas, dan kekurangan nutrisi. PUD mempunyai beberapa komplikasi termasuk pendarahan dalaman, penyekatan saluran gastrousus, penembusan dan refraktori ulser peptik (Kaushik et al. 2011; Roy 2016).



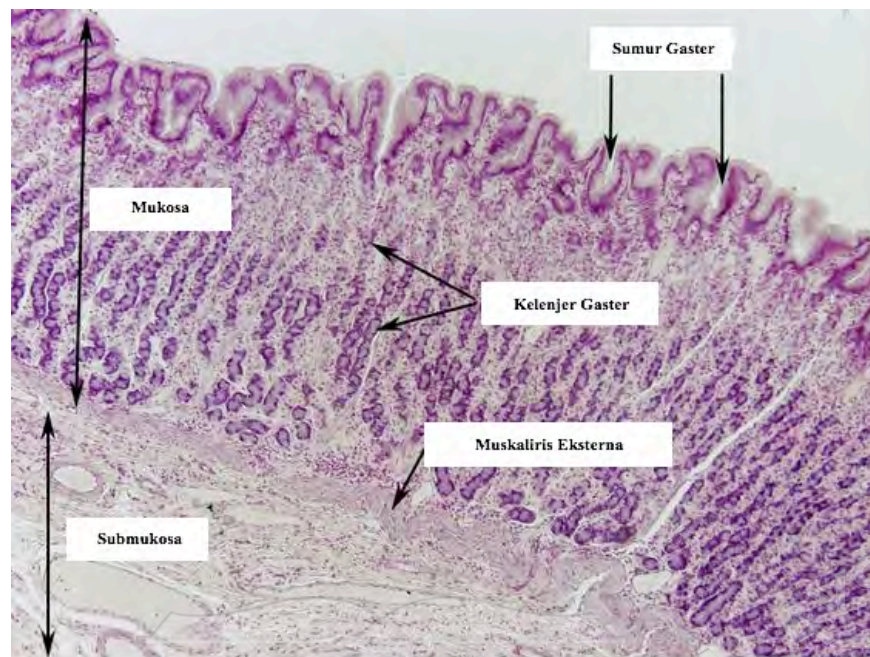
Rajah 2.1 Faktor-faktor yang menyumbang kepada penyakit ulser peptik (PUD)

2.1.1 HISTOLOGI GASTER DAN PENYAKIT ULSER PEPTIK

Perut adalah bahagian utama saluran gastrousus (GI) yang terletak di antara esofagus dan duodenum. Fungsinya adalah untuk mencerna makanan dengan asid gaster sehingga ke zarah yang lebih kecil menggunakan pencernaan kimia dan mekanikal. Perut dapat melaksanakan fungsi ini disebabkan oleh lapisan dinding perut yang terbahagi kepada mukosa gaster, submukosa, muskalis eksterna dan serosa (Owen

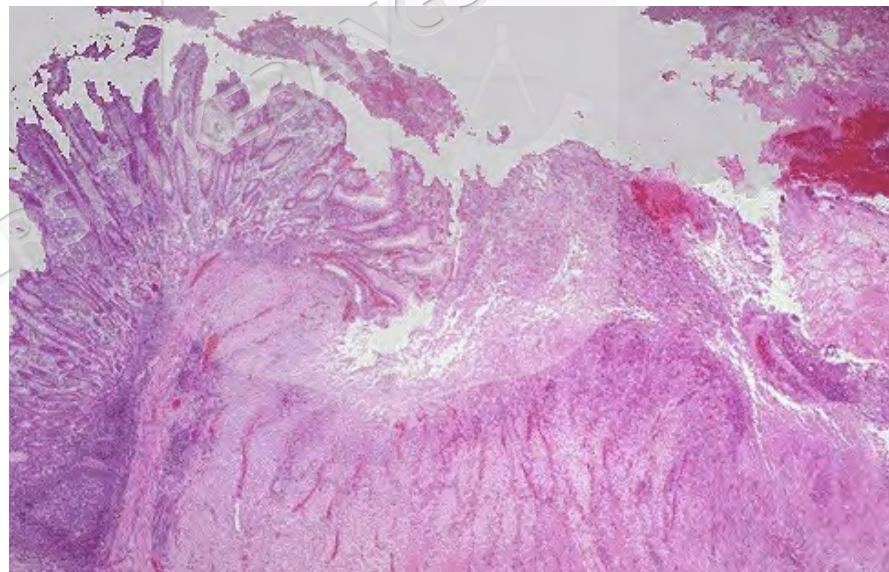
1986). Mukosa gaster terletak di lapisan dinding perut yang dibentuk oleh lapisan permukaan epitelium, lamina propria dan muskaliris mukosa. Epitelium kolumnar selapis '*simple columnar epithelium*' merupakan permukaan epitelium yang membentuk di dalam perut sebagai permukaan sel mukus dan menghasilkan banyak penginvaginatan '*invaginations*' kecil atau sumur gaster. Sumur gaster ini penting kerana ia menghubungkan ke pelbagai kelenjar gaster. Terdapat tiga jenis kelenjar yang terdapat di dalam gaster ('*cardiac*', gaster '*gastric*' dan '*pyloric*'). Kelenjar ini menghasilkan enzim pencernaan dan merembeskan mukus. Kelenjar gaster pada bahagian fundus / badan mempunyai peranan penting untuk menghasilkan jus gaster pencernaan manakala kelenjar '*cardiac*' dan '*pyloric*' kebanyakannya menghasilkan rembesan mukus yang melindungi gaster dari kesan asid pencernaan yang berlebihan dan mencegah gaster dari '*self-digestion*'. Sumur gaster dan kelenjar gaster terdiri daripada lima jenis sel yang sama; sel leher mukus, sel induk, sel parietal (oksintik), sel utama (zimogen) dan sel '*enteroendocrine*' (Owen 1986; Varela et al. 2021).

Ulser peptik gaster merupakan perforasi mukosa yang menembusi muskaliris eksterna dan lamina propria yang biasanya terhasil oleh keagresifan asid-pepsin. Margin ulser adalah perpendikular dan mengalami gastritis kronik. Dalam permukaan gastritis kronik, limfosit, monosit dan sel plasma akan menyusup ke dalam mukosa dan submukosa (Malik et al. 2021). Semasa fasa aktif, asas ulser menunjukkan empat zon, iaitu nekrosis fibrinoid, eksudat keradangan, tisu granulasi dan tisu fibrosa. Ulser aktif boleh dibarisi oleh lapisan nipis puing '*debris*' fibrinoid yang dilapisi oleh penyusupan keradangan predomanan neutrofilik. Di bawahnya, penyusupan tisu granulasi dengan leukosit mononuklear serta fibrosa atau parut berkolagen yang membentuk asas ulser. Pembuluh dinding di dalam kawasan parut biasanya menebal dan kadang-kadang mengalami thrombosis (Klatt et al. 2006; Lanas & Chan 2017; Turner 2014).



Rajah 2.2

Histologi normal gaster
Sumber dari Anon. (2021)



Rajah 2.3

Histologi Kronik Ulser Peptik
Sumber dari Anon. (2021)

2.2 *HELICOBACTER PYLORI*

H. pylori adalah bakteria gram-negatif mikroaerofilik (organisma yang memerlukan jumlah oksigen yang sedikit untuk hidup) bersifat motil, berflagelum dan berbentuk spiral yang hidup pada lapisan mukosa dan gaster antrum dalam persekitaran perut. *H. pylori* mula ditemui oleh dua saintis Australia, iaitu Barry Marshall dan Robin Warren pada tahun 1982-1983 di mana mereka dianugerahkan hadiah Nobel pada tahun 2005 (Pincock 2005; Robin Warren & Marshall 1983). Jangkitan *H. pylori* adalah penyebab utama PUD dan menyumbang kepada 30 – 40 % punca PUD. Prevalens jangkitan *H. pylori* berbeza-beza mengikut kawasan geografi, umur, status sosio-ekonomi, tahap pendidikan, persekitaran hidup, dan pekerjaan (Wang et al. 2014). Sebahagian besar jangkitan *H. pylori* berlaku di negara-negara membangun di mana sehingga 80 % orang dewasa pertengahan umur kemungkinan dijangkiti (Wang & Peura 2011; Wang et al. 2014). Golongan tua (geriatrik) merupakan kumpulan yang sangat berisiko berbanding kumpulan umur yang lebih muda. Bagi ulser gaster, 70 % penyebab adalah akibat jangkitan *H. pylori* (Jianyuan Chai 2011). Jangkitan *H. pylori* secara semula jadi berlaku sebahagian besar pada zaman kanak-kanak melalui laluan najis-oral dan oral-oral (Alvarez et al. 2013; Sampieri 2013). Jangkitan ini mengaruh tindakbalas keradangan yang tidak membasmi kolonisasi bakteria, malah ia mungkin berterusan untuk seumur hidup (De Falco et al. 2015; Parreira et al. 2013).

Urutan perlahan yang dikenali sebagai lata Correa (*Correa's cascade*) melalui satu siri perantaraan berperingkat (lesi pra-kanser) sebelum mencapai kemaglinanan (*malignancy*). Lesi pra-berkanser ini berlaku dalam turutan berikut: gastritis, atrofi, metaplasia usus, dan akhirnya displasia (Boreiri et al. 2013; Correa 1992). Di kalangan individu yang dijangkiti, kira-kira 10 % menjalani lesi gaster yang teruk seperti PUD, 1-3 % membawa kepada kanser gaster dengan kadar kelangsungan hidup lima tahun yang rendah, dan 0.1 % menghasilkan tisu limfoid berkaitan mukosa (MALT) limfoma (Cirak et al. 2007; Conteduca et al. 2013; Mégraud et al. 2015). Dianggarkan bahawa individu yang dijangkiti *H. pylori* mempunyai lebih daripada dua kali ganda peningkatan risiko mendapat kanser gaster berbanding dengan yang tidak dijangkiti (Demirel et al. 2013; Queiroz et al. 2012). Walaupun penurunan yang dramatik dalam insidens dan mortaliti telah diperhatikan dalam beberapa dekad kebelakangan ini,

namun kanser gaster adalah salah satu kanser yang paling biasa dan punca ketiga kematian berkaitan kanser di seluruh dunia dengan kematian lebih daripada 700,000 setiap tahun (Boreiri et al. 2013; Etemadi et al. 2020; Melton et al. 2010; Thrift & El-Serag 2020). Jangkitan *H. pylori* boleh didiagnos menggunakan kaedah invasif atau bukan invasif. Kaedah invasif adalah berasaskan biopsi dan dikulturkan pada media khas, pewarnaan irisan tisu dan ujian biopsi urease. Manakala kaedah bukan invasif dilakukan melalui ujian pernafasan urea, serologi dan ujian pengesanan *H. pylori* dalam spesimen najis melalui air kencing atau darah (Cosgun et al. 2016; Fashner & Gitu 2015).

2.3 PATOGENESIS JANGKITAN *H. PYLORI*

Gastritis *H. pylori* dicirikan oleh infiltrasi mukosa gaster pada kedua-dua sel keradangan akut (leukosit polimorfonuklear) dan sel keradangan kronik (limfosit, sel plasma, dan makrofaj). *H. pylori* pada awalnya lebih banyak didapati di kawasan antrum, di mana tiada sel parietal (penghasil asid) dengan itu rembesan asid tidak berlaku secara langsung (Shiotani et al. 2013). Perkembangan dan keterukkan pola gastritis bergantung pada interaksi pelbagai faktor: (1) Ciri-ciri *H. pylori* termasuk keplastikan genom, kapasiti untuk penyesuaian kepada keadaan hos individu, modulasi reaksi kepada tindakbalas sistem imun hos dan kehadiran dan pengeluaran pelbagai faktor virulens; (2) Faktor hos, sebagai contoh, latar belakang genetik atau keadaan fisiologi dan imunologi, terutamanya yang meningkatkan atau mengurangkan tindakbalas keradangan terhadap jangkitan; (3) faktor persekitaran seperti merokok, diet, garam yang tinggi, dan pengambilan daging (Sampieri 2013; Shiotani et al. 2013). Hanya subset individu yang dijangkiti menghidap penyakit gaster yang serius dan mekanisme kepatogenan *H. pylori* masih belum difahami dengan jelas (Chiariotti et al. 2013; Lillehoj et al. 2012). Mekanisme di mana *H. pylori* menyebabkan penyakit pada manusia boleh digambarkan sebagai proses berperingkat di mana bakteria perlu mengelak aktiviti bakterisidal daripada sekatan asid gaster dan memasuki lapisan mukus (pengkolonian) dan kemudian ia perlu menyesuaikan diri dan membiak di bawah keadaan persekitaran mukus gaster (berterusan) (De Luca et al. 2004; Kao et al. 2016; Manente et al. 2008).

Beberapa faktor virulens bakteri telah dikaitkan dengan perkembangan penyakit gaster. Langkah pertama yang penting dalam jangkitan adalah perlekatan *H. pylori* kepada mukosa gaster hos dan motiliti bakteri. Keadaan ini mencetuskan ekspresi beberapa gen bakteri, termasuk beberapa faktor yang mengekod virulens, dan melindungi patogen daripada mekanisme klearans seperti aliran cecair, pergerakan peristalsis, atau penanggalan lapisan mukus (Kim et al. 2004; Parreira et al. 2013). Urease dan flagelin didapati faktor penting untuk kolonisasi bakteri kepada mukosa gaster (Dunn & Phadnis 1998; O' Toole et al. 2000; Perrais et al. 2014). Urease mampu menukar urea kepada ammonia dan karbon dioksida untuk membentuk awan asid peneutral ammonia, meningkatkan pH kepada neutral, dan melindungi bakteri dari keasidan gaster (Celli et al. 2009; Perrais et al. 2014). Hidrolisis urea dicapai dengan pengambilan urea melalui tembok saluran proton yang membolehkan hidrolisis di dalam bakteri dan mewujudkan lapisan neutral nipis di sekeliling permukaan luar selnya (Celli et al. 2009; Weeks et al. 2000). Sebaik sahaja bakteri mewujudkan persekitaran yang dikehendaki dari segi pH, langkah seterusnya adalah keupayaan untuk berenang melalui lapisan pelindung mukus gaster dalam perut hos (Celli et al. 2009). Kajian telah melaporkan bahawa urease mampu mengaruh peningkatan pH *H. pylori* yang mengurangkan kelikatanjalaran 'viscoelasticity' di dalam gel musin, mencetuskan peralihan dari gel kepada sol (cecair) 'gel-sol transition' musin gaster dan seterusnya membolehkan bakteri bergerak bebas melalui mukus (Celli et al. 2009). Flagelum (5-7 setiap sel) memberi motiliti kepada sel-sel; ia diperbuat daripada polimer dua subunit, *FlaA* flagelin major dan *FlaB* flagelin minor (Perrais et al. 2014). Selain itu, *H. pylori* menghasilkan pelbagai faktor virulens mampu menyahkawalselia laluan isyarat intrasel hos. Antara semua faktor-faktor virulens, sitotoksin berkaitan gen A (*Cag A*) dan pepulau kepatogenan (*cag-PAI*), membentuk vakuol sitotoksin A (*Vac A*) dianggap sebagai faktor patogenik major (Iaquinto et al. 2000; Kao et al. 2016; Manente et al. 2008).

2.3.1 Faktor Virulens *H. pylori*

Perbezaan yang berkaitan dengan penyakit disebabkan *H. pylori* adalah kehadiran atau ketiadaan *cag-PAI*. Kawasan *cag-PAI* adalah 40 kb serpihan genomic yang mengandungi kerangka bacaan terbuka (ORFs) yang mewakili 31 gen termasuk protein

cagA dan sistem rembesan *cag* jenis IV (T4SS). T4SS membentuk struktur seperti jarum yang menonjol dari permukaan bakteria yang mampu menembusi sel-sel epitelium gaster dan memudahkan pemindahan *cagA*, peptidoglikan, dan mungkin faktor bakteria lain ke dalam sasaran sel hos (Backert et al. 2015; Odenbreit et al. 2001; Tegtmeyer et al. 2011; Zhang et al. 2017). Apabila telah berada di dalam sel epitelium gaster, *cagA* akan mengalami fosforilasi tirosina yang membawa kepada tindak balas sel faktor pertumbuhan dan penghasilan sitokin oleh sel hos (Tummala et al. 2004). Oleh kerana fungsi ini, strain *H. pylori cagA*⁺ berkait rapat dengan risiko peningkatan yang signifikan kepada gastritis yang teruk, gastritis atrofik, penyakit ulser peptik dan kanser gaster bahagian distal berbanding dengan strain *cagA*⁻ (Schöttker et al. 2012; Yordanov et al. 2017).

Lokus kedua keheterogenan *H. pylori* adalah gen *vacA* yang mengekod sitotoksin vakuola. *VacA* adalah rembesan toksin protein yang menyebabkan hakisan ke atas sel epitelium gaster yang dijangkiti. Walaupun fakta mengatakan bahawa 100% daripada strain *H. pylori* membawa gen *vacA*, hanya 50 % daripada strain *H. pylori* menghasilkan protein *vacA* yang berfungsi. Strain *H. pylori* yang mengekspres aktiviti vakuola sering didapati dalam kalangan pesakit PUD dan kanser gaster bahagian distal berbanding pesakit yang mengalami jangkitan pada permukaan gaster sahaja (Atherton et al. 1995; Cover & Blaser 1992; Denic et al. 2020; Tan et al. 2005).

2.3.2 Tindakbalas Hos Terhadap *H. Pylori*

Tindakbalas imun terhadap bakteria patogen boleh dibahagikan kepada tindakbalas semula jadi dan tindakbalas penyesuaian. Tindakbalas semula jadi terhadap jangkitan bakteria adalah proses awal yang tidak spesifik, yang bertindak balas dengan cepat ke atas beberapa molekul bakteria untuk mengisyarat jangkitan berbahaya dan bertujuan untuk membunuh bakteria itu. Sebaliknya, dalam tindakbalas imun penyesuaian ditangguhkan, kehadiran antigen-spesifik, membawa kepada pengaktifan T-sel, B-sel dan sel memori yang dibentuk oleh tindakbalas imun semula jadi (Portal-Celhay & Perez-Perez 2006).

a. Keimunan Semula Jadi

Pengecaman molekul bakteri oleh sistem imun semula jadi di perantara oleh tol-seperti reseptor (TLRs) yang diungkap oleh sel penyaji antigen (APCs) seperti monosit dan sel dendritik (DCs). Kontak bakteri dengan monosit dan APCs lain membawa kepada rembesan sitokin pro-inflamatori seperti faktor nekrosis tumor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β) dan interleukin-8 (IL-8). Jangkitan *H. pylori* adalah berkait rapat dengan peningkatan aras sitokin, di mana ia bertindak sebagai ‘chemoattractant’ setempat, mengakibatkan infiltrasi granulositik (Crabtree 1996; Prabhu & Shivani 2014). Setakat ini, banyak kajian ke atas tindakbalas imun semula jadi terhadap *H. pylori* dalam sel epitelium telah memberi tumpuan terhadap TLR4, iaitu ‘pengecaman molekul patogen’ (PRM) kepada lipopolisakarida (LPS) gram-negatif, iaitu induksi keradangan yang utama. Walau bagaimanapun, LPS *H. pylori* menunjukkan aktiviti endotoksik yang sangat rendah berbanding dengan LPS bakteria Gram-negatif tipikal, seperti *Escherichia coli*, yang berpotensi menyumbang kepada jangkitan yang berterusan (Kidd et al. 1997; Shimoyama et al. 2011). Walau bagaimanapun, titisan sel epitelium gaster tidak memberi tindakbalas kepada LPS *H. pylori*, walaupun dengan kehadiran kepekatan endotoksin yang agak tinggi kepada sel (Bäckhed et al. 2003; Fujimoto et al. 2012; Shimoyama et al. 2011). Maka, antibodi TLR4 ‘TLR4-neutralizing antibody’ tidak menghalang *H. pylori* yang mengaruh rembesan pro-keradangan IL-8 di dalam titisan sel adenokarsinoma gaster (AGS) (Su et al. 2003). Terdapat dua lagi TLR tambahan, iaitu TLR2 dan TLR5 yang mengambil bahagian secara aktif dalam tindakbalas imun semula jadi kepada bakteria gram-negatif melalui pengecaman daripada lipoprotein dan flagelin (Smith et al. 2003).

b. Tindakbalas Imun Selular dan Tindakbalas Humoral

Jangkitan *H. pylori* mengaruh kedua-dua tindakbalas imun selular dan humoral. Tindakbalas inflamatori ini bermula dengan pengaktifan neutrofil, diikuti limfosit (T-sel dan B-sel), sel plasma dan makrofaj, berserta dengan degenerasi sel epitelium dan kecederaan (De Falco et al. 2015; Goodwin et al. 1986). Jika *H. pylori* menyerang mukosa gaster, ia akan memicu tindakbalas hos terutamanya pikatan bakteria kepada sel epitelium. *H. pylori* akan menghasilkan beberapa bahan antigenik, termasuk protein

kejutan haba (*Heat Shock Proteins*, HSP), enzim urease dan LPS, di mana semuanya boleh ditarik dan diproses oleh makrofaj yang terdapat dalam lamina propria dan seterusnya mengaktifkan T-sel (Di Tommaso et al. 1995; Portal-Celhay & Perez-Perez 2006). Gangguan selular, terutamanya di bahagian persimpangan ketat epitelium (*epithelial tight junctions*), dan peningkatan penyampaian antigen kepada lamina propria memudahkan stimulasi tindakbalas imun. Dengan ini pengeluaran inflamatori sitokin seperti IL-1, IL-6, TNF- α dan IL-8 akan ditingkatkan (Almasaudi et al. 2016; Crabtree 1996b; Fan et al. 1995).

Gastritis aktif kronik dikaitkan dengan pertambahan nisbah T-sel CD4/CD8 (*cluster of differentiation*, CD) di dalam mukosa gaster, disebabkan oleh pengumpulan limfosit sel pembantu CD4⁺ dalam lamina propia. Jangkitan *H. pylori* akan menyebabkan tindakbalas imun hos Th1 (*T helper type 1*) adalah predominan dalam mukosa gaster, yang dicirikan oleh induksi interferon- γ (IFN- γ) dan gen yang berkaitan IFN- γ . Tindakbalas imun Th1-predominan dikaitkan dengan kepekatan yang tinggi pro-inflamatori sitokin IL-12, IL-18 dan TNF- α (Bagheri et al. 2018; Tummala et al. 2004). Keparahan gaster akibat jangkitan *H. pylori* dikaitkan dengan pengekspresan TNF- α dan IFN- γ mukosa (Flach et al. 2011; Lehmann et al. 2002). Latarbelakang genetik hos menyumbang kepada tindakbalas imun dan inflamatori terhadap jangkitan *H. pylori*. Gen IL-1 β mengekod pengekspresan IL-1 β , sitokin pro-inflamatori dan perencat rembesan asid gaster yang memainkan peranan utama dalam memula dan memperkuat tindakbalas inflamatori terhadap jangkitan *H. pylori* (Álvarez-Arellano 2014; Noach et al. 1994).

Individu yang dijangkiti *H. pylori* mendapat tindakbalas sistemik spesifik dan antibodi setempat yang kuat dengan menunjukkan kehadiran isotaip IgA, IgM, dan IgG (*Immunoglobulin*, Ig) (Rathbone et al. 1986; Vorobjova et al. 2006). Kajian-kajian terdahulu melaporkan bahawa pengikatan IgG terhadap *H. pylori* menggalakkan fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear (Tosi & Czinn 1990; Yordanov et al. 2017). Strain *H. pylori* rentan kepada komplemen dan mengaktifkannya melalui mana-mana laluan klasik, walaupun dalam ketakhadiran antibodi spesifik, atau melalui laluan alternatif (Berstad et al. 2001; Gonzalez-Valencia et al. 1996). Walaupun dalam tindakbalas imun yang kuat ini, *H. pylori* tidak dapat dihapuskan melainkan individu

yang dijangkiti dirawat dengan gabungan antibiotik, dan biasanya menghasilkan jangkitan kronik seumur hidup. Pengamatan ini menunjukkan bahawa mukus gaster boleh menjadi nic pelindung di mana *H. pylori* wujud dan tak tercapai oleh tindakbalas antibodi spesifik atau fungsi efektifnya. Tindakbalas humoral yang tidak berkesan ke arah *H. pylori* dan komponennya akan menyumbang kepada patogenesis (Denic et al. 2020; Israel & Peek 2001; Janulaityte-Gunther et al. 2005).

2.3.3 Imunomodulasi oleh *H. pylori*

Untuk mengekalkan kolonisasi yang berpanjangan di dalam mukosa gaster manusia, *H. pylori* mesti mengelak daripada kedua-dua tindakbalas imun semula jadi dan imun penyesuaian. Berikutan jangkitan dengan *H. pylori*, DCs memfagositosis protein bakteria dan mengekspres peptida pada permukaannya, bersama-sama dengan kompleks kehistoserasian major '*major histocompatibility complex*' (MHC) dan molekul *co-stimulatory*. Penyampaian antigen ini membawa kepada pengaktifan T-sel CD4⁺ yang bertindakbalas terhadap antigen ini dan memicu tindakbalas imun. T-sel CD4 boleh dibezakan melalui pengaktifan kepada sel Th1 atau sel Th2, yang mempunyai perbezaan dalam jenis sitokin yang dihasilkannya. Sitokin yang dicungkil oleh agen jangkitan (terutamanya IFN- γ , IL-2 dan IL-4), *co-stimulators* yang digunakan untuk memacu tindakbalas dan sifat ligan peptida MHC kesemuanya mempunyai kesan (Bamford et al. 1998; Portal-Celhay & Perez-Perez 2006).

Kesan daripada aruhan sel Th1 adalah lebih parah berbanding sel Th2, di mana pengeluaran sel-sel Th1 membawa kepada pengimunan sel-perantara dan pengeluaran '*opsonizing*' kelas antibodi (terutamanya IgG), manakala pengeluaran sel-sel Th2 menyebabkan keimunan humoral. Kebanyakan bakteria intrasel mengaruh tindakbalas Th1, manakala patogen ekstrasel merangsang tindakbalas jenis Th2. Majoriti antigen spesifik *H. pylori* klon T-sel yang tersendiri daripada mukosa gaster yang dijangkiti dengan menghasilkan aras IFN- γ yang lebih tinggi berbanding IL-4, yang memantul tindakbalas jenis Th1 (Álvarez-Arellano 2014; Bamford et al. 1998). *H. pylori* juga merangsang pengeluaran IL-12 secara *in-vitro*, sitokin yang menggalakkan pembezaan Th1. Penemuan ini meningkatkan hipotesis bahawa tindakbalas hos (Th1) yang aberan kepada organisma yang diramalkan untuk mengaruh rembesan tindakbalas imun (Th2)

boleh mempengaruhi dan mengekalkan keradangan gaster. Model haiwan *H. pylori* teraruh gastritis telah menyokong kesimpulan ini (Sawai et al. 1999; Shi et al. 2005).

Faktor bakteria juga menyumbang kepada permulaan polarisasi Th1 *H. pylori* spesifik tindakbalas imun. Deml et al. (2005) telah mengenalpasti *Helicobacter cysteine-rich protein A* (HcpA) sebagai pro-inflamatori dan Th1 penggalak protein yang novel. Kajian menggunakan sel limpa daripada tikus naif *H. pylori*-negatif, mendapati bahawa HcpA mengaruh pro-inflamatori (IL-6 dan TNF- α) dan Th1-penggalak sitokin (IL-12 dan IFN- γ), dan Th2 penggalak sitokin IL-4 dan IL-5 (Deml et al. 2005). Kajian-kajian terdahulu menerangkan bahawa terdapat tiga fenotip subset berbeza daripada T-sel pengawalan penindas '*suppressor-regulatory T-cell*', iaitu satu atau lebih antigen penanda permukaan '*surface-marker antigens*' dan / atau profil pengeluaran sitokin '*cytokine-production*' seperti (pengawalan T-sel CD4⁺ CD25⁺ semula jadi (Treg), sel Tr1 yang merembeskan IL-10 dan sel Th3 yang merembeskan TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*)) telah menunjukkan dalam kajian secara *in-vitro* dan *in-vivo* dapat berfungsi untuk menyekat proliferasi dan rembesan sitokin daripada T-sel efektor (Groux et al. 1997; Sakaguchi et al. 1995; Weiner 2001). Pengaktifan T-sel pengawalan termasuk sel regulatori T (Tregs) dan sel Tr1, mungkin mengakibatkan tindakbalas patologi berkurang dan pengekalan jangkitan yang berpanjangan sebagai mekanisme untuk penyelenggaraan '*pathogen-specific immunological memory*' (Raghavan & Holmgren 2005). Treg memainkan peranan dalam keradangan pemodulasian jangkitan *H. pylori*. Kajian Lundgren et al. (2003) membuktikan bahawa ingatan tindakbalas T-sel telah ditingkatkan apabila stimulasi antigen yang spesifik daripada darah limfosit periferall yang diambil daripada subjek yang dijangkiti oleh *H. pylori* apabila populasi sel susut dari Treg. Kajian ini menunjukkan bahawa Treg boleh mengurangkan imunopatologi dalam gastritis *H. pylori*, mungkin dengan mengurangkan pengaktifan IFN- γ menghasilkan T-sel CD4⁺.

2.3.4 Pencegahan Tindakbalas Imun oleh *H. pylori*

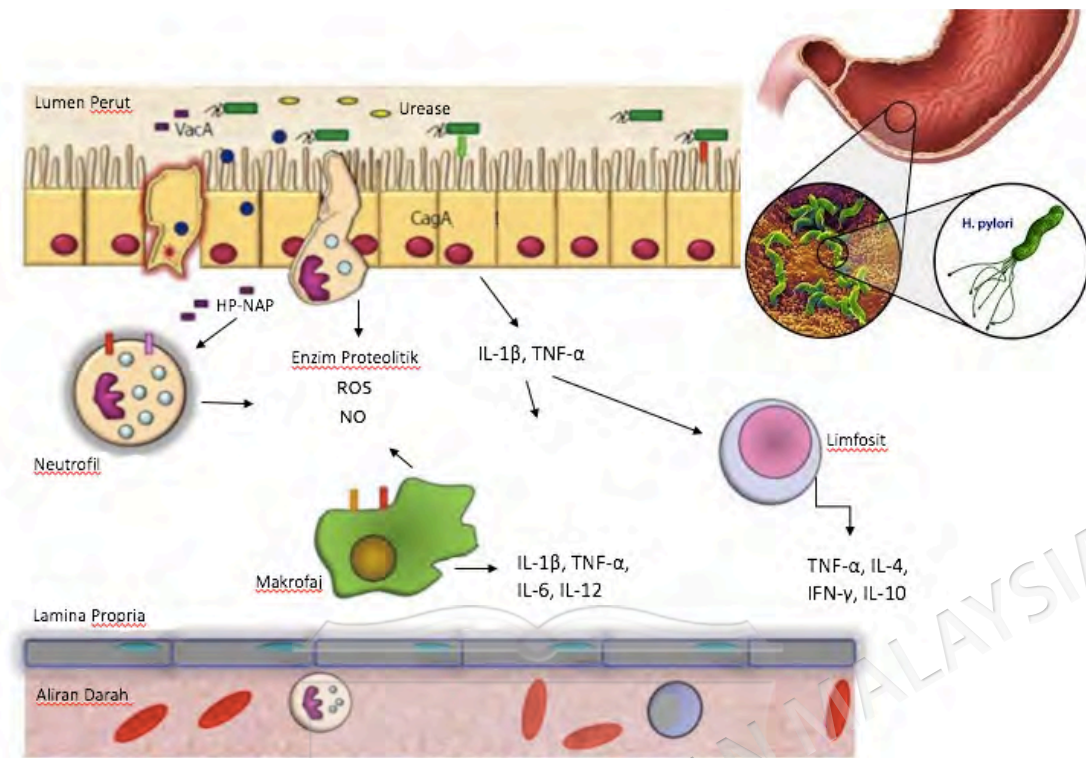
Pencegahan tindakbalas semula jadi nitrik oksida (NO) adalah komponen utama sistem imun semulajadi dan ejen antimikrob yang berkesan (Nathan & Shiloh 2000). *H. pylori* mencegah pengeluaran NO oleh sel hos dengan menghasilkan enzim arginase. Enzim ini dikodkan oleh gen *rocF*, dan bersaing dengan nitrik oksida sintase 2 (NOS2) untuk substrat l-arginine dan menukar kepada urea dan l-ornithine, bukannya NO (Gobert et al. 2001). Semasa jangkitan *H. pylori*, bakteria boleh hidup di dalam sel makrofaj dengan mengganggu protein lisosom, sama seperti yang dilakukan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (Ramarao & Meyer 2001). Oleh itu, walaupun terdapat tindakbalas imun semulajadi terhadap *H. pylori*, ianya kurang berkesan untuk menghapuskan jangkitan. Dalam satu kajian oleh Allen et al. (2000), kelewatan fagositosis bakteria ke dalam makrofaj diikuti dengan pembentukan *megasome* akibat daripada cantuman fagosom. *Megasome* menghalangi bakteria di dalam sel daripada dikorbankan dengan efisien. Tambahan pula, kajian menggunakan sel monosit dan sel polimorfonukleus daripada darah manusia telah menunjukkan bahawa jangkitan *H. pylori* yang mempunyai kehadiran cagPAI mampu menyekat penyerapan bakteria *H. pylori* itu sendiri (Ramarao & Meyer 2001; Ramarao et al. 2000).

2.3.5 Penghasilan Tekanan Oksidatif (Tindakbalas Hos)

Kehadiran *H. pylori* menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) dan spesies nitrogen reaktif (RNS) yang dihasilkan oleh hos dalam mukosa gaster. Walaupun terdapat banyak jenis sel yang boleh menyumbang kepada pengeluaran ROS / RNS, termasuk sel-sel epitelium, namun neutrofil merupakan penyumbang jumlah terbesar kepada pengeluaran ROS / RNS (Handa et al. 2010; Naito & Yoshikawa 2002; Sarıkaya & Doğan 2020). Fosfat nikotinamide adenine dinukleotida (NADPH oksidase [Nox]) pada membran sel adalah pemangkin pengeluaran ROS untuk membunuh bakteria (Allen et al. 2000; Brandes et al. 2014; Lambeth 2004). Semasa proses ini, Nox diaktifkan untuk menerima elektron daripada NADPH, yang didermakan kepada oksigen untuk menghasilkan superoksida (O_2^-). Kemudian O_2^- ditukar kepada hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh pemangkin superoksida dismutase. H_2O_2 kemudian ditukar kepada asid hipoklorus yang lebih toksik. Di samping itu, H_2O_2 bertindakbalas dengan O_2^- untuk

membentuk radikal hidroksil (OH). Dengan ini, ROS dapat membunuh mana-mana bakteri dalam neutrofil. Walau bagaimanapun, pemisahan antara neutrofil dalam tisu dan bakteri di lumen menyukarkan untuk membunuh semua *H. pylori* yang hadir. Oleh itu, percubaan berterusan untuk berbuat demikian dianggap mengakibatkan keradangan kronik-aktif dan kerosakan kepada mukosa gaster untuk jangkitan yang berpanjangan.

Kehadiran *H. pylori* mengakibatkan kemasukan sel-sel fagositik dalam usaha untuk membersihkan jangkitan. Makrofaj dan neutrofil akan fagosit ‘*phagocytize*’ bakteri *H. pylori*, dimana ia bertujuan untuk membunuh bakteri *H. pylori* bersama dengan ROS / RNS. Di samping itu, neutrofil hos dan sel-sel epitelium juga mengekspresi enzim kritikal, nitrik oksida sintase teraruh (iNOS), yang menghasilkan NO (Cherdantseva et al. 2014; Fu et al. 1999). Reaksi NO dengan logam dan O_2^- menghasilkan peroksinitrit, merupakan oksida yang kuat. Jangkitan *H. pylori* mengakibatkan pembentukan ROS dan RNS dengan meningkatkan ekspresi sel imun Nox dan iNOS. Pesakit yang dijangkiti *H. pylori* akan mendapat peningkatan aras ROS bersama dengan peningkatan NO berasal metabolit ‘*NO-derived metabolites*’, dimana ia menunjukkan pengaktifan iNOS (Butcher et al. 2017; Cherdantseva et al. 2014; Ma et al. 2013). Subunit NADPH Nox1 yang di ekspres dalam tisu gaster mungkin menyumbang kepada pengeluaran ROS semasa jangkitan *H. pylori*. ROS dihasilkan pada aras yang jauh lebih rendah dalam sel epitelium berbanding dengan sel fagositik dari tindakbalas imun dan ini akan menyumbang kepada isyarat sensitif redoks dan mungkin secara tidak langsung membunuh *H. pylori* (Ding et al. 2007; Holokai et al. 2019). Di samping itu, dwi oksida yang terletak pada sel-sel epitelium gaster diketahui menghasilkan H_2O_2 sebagai tindakbalas kepada jangkitan, yang juga menyumbang kepada aras ROS. Gabungan pengeluaran ROS dari fagositik dan sel-sel epitelium menghasilkan tekanan oksidatif (Grasberger et al. 2013).



Rajah 2.4

Patogenesis dan tindakbalas *H. pylori*

Ubahsuai daripada Álvarez-Arellano (2014)

2.4 RAWATAN TERHADAP JANGKITAN *H. PYLORI*

Terdapat pelbagai pendekatan kepada pembasmian jangkitan disebabkan oleh *H. pylori*. Salah satu cara yang digunakan secara meluas ialah terapi tiga serangkai yang merupakan gabungan dua antibiotik seperti Amoxicillin bersama Clarithromycin atau Metronidazole dengan perencat pam proton (PPI) (Safavi 2016). Namun, rawatan pembasmian jangkitan *H. pylori* boleh menyumbang kepada masalah kerintangan antibiotik, pematuhan pesakit yang lemah kepada ubat dan ketidaktoleransi kepada regimen terapeutik (Niv & Rokkas 2015). Antara penyebab kepada kegagalan rawatan adalah masalah penetrasi ubat yang lemah, kepekatan ubat yang rendah, masa penyimpanan ubat di dalam gaster yang pendek dan kerintangan antibiotik. Selain itu, kestabilan antibiotik yang rendah dalam kandungan gastrik memerlukan pengambilan yang kerap yang akan menyebabkan penurunan pematuhan terhadap regimen rawatan pesakit (Graham et al. 2014). Dengan ini menjadi satu keperluan untuk membangunkan ubat baharu yang boleh meningkatkan keberkesanan regimen terapeutik (Hajiani 2009).

Terdapat beberapa jenis terapi untuk merawat jangkitan *H. pylori* seperti terapi piawai tiga serangkai, turutan, '*quadruple*', '*concomitant*' dan terapi '*levofloxacin*' (Paul et al. 2017). Pemilihan jenis ubat untuk regimen jangkitan *H. pylori* dipengaruhi oleh pelbagai faktor termasuk keberkesanan, toleransi pesakit, kewujudan kerintangan antibiotik dan harga ubat-ubatan. Kadar pembasmian perlu ditingkatkan kepada 90% melawan jangkitan *H. pylori* (Malekzadeh et al. 2004). Berikutan regimen terapi tiga serangkai selama 7 hari, kadar pembasmian kurang daripada 80% telah berulang kali dilaporkan di beberapa negara. Maka, regimen selama 14 hari telah dicadangkan untuk meningkatkan kadar pembasmian (Graham & Fischbach 2010; Savoldi et al. 2018). Kajian sistematik *Cochrane* dan meta-analisis dalam rangkaian yang besar mendapati bahawa regimen 14 hari mencapai kadar pembasmian yang lebih tinggi berbanding regimen 7 dan 10 hari, walaupun kenaikan terapeutik hanya +8% (Li et al. 2015; Yuan et al. 2013). Tambahan pula, kajian sistematik *Cochrane* yang lain juga melaporkan kadar pembasmian yang tinggi sebanyak 83.5% bagi rawatan terapi tiga serangkai menggunakan (PPI, Amoxicillin dan Clarithromycin) berbanding rawatan terapi tiga serangkai menggunakan (PPI, Clarithromycin dan Metronidazole) dan (PPI, Amoxicillin dan Metronidazole), dengan kadar pembasmian masing-masing sebanyak 68.6% dan 82%; setiap terapi yang berlangsung selama 14 hari (Yuan et al. 2013).

Pada masa kini, penurunan kadar pembasmian rawatan terapi tiga serangkai disebabkan oleh kerintangan antibiotik adalah rendah daripada 80% (Yoon et al. 2016). Apabila kerintangan antibiotik terjadi khususnya kepada Clarithromycin dibandingkan kepada antibiotik kedua dalam regimen (Amoxicillin atau Metronidazole), menjadi penyebab utama kegagalan rawatan dalam terapi tiga serangkai (Alarcón-Millán et al. 2016; De Francesco et al. 2006). Beberapa kajian menunjukkan bahawa kerintangan antibiotik dan ketidakpatuhan pesakit kepada ubat menjadi punca kegagalan rawatan terhadap jangkitan ini. Ini menyumbang kepada penurunan kadar pembasmian terapi tiga serangkai di seluruh dunia (Chang et al. 2017; Kim et al. 2015; Zhang 2015). Namun hingga kini, penggunaan terapi tiga serangkai berasaskan Clarithromycin mempunyai sokongan oleh badan organisasi dalam gastroenterologi, bagaimanapun dengan beberapa pembatasan. Konsensus Toronto pada tahun 2016 mengesyorkan penggunaan terapi tiga serangkai berasaskan Clarithromycin di kawasan-kawasan yang mempunyai kerintangan Clarithromycin yang rendah atau kadar kejayaan pembasmian

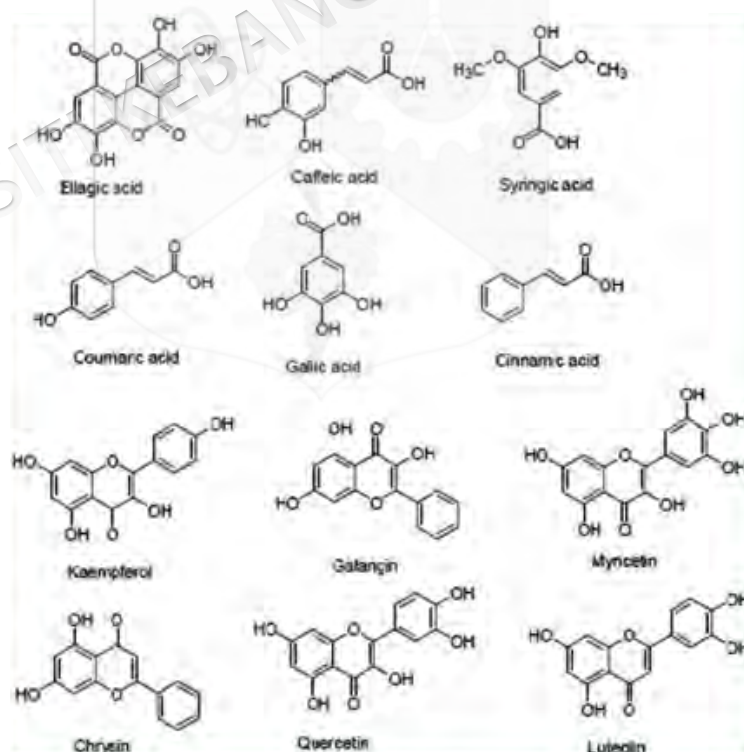
yang tinggi (Fallone et al. 2016). Garis panduan dari Kolej Gastroenterologi Amerika (ACG) pada tahun 2017 juga menyokong penggunaan terapi tiga serangkai berasaskan Clarithromycin sekiranya pesakit tidak mempunyai pendedahan kepada Clarithromycin sebelumnya dan kerintangan terhadap Clarithromycin di kawasan geografi tersebut dijangka rendah (Chey et al. 2017).

2.5 MADU DALAM BIDANG PERUBATAN

Madu telah digunakan sejak zaman purba sebagai produk makanan serta ubat-ubatan tradisional untuk mengubati pelbagai jenis penyakit disebabkan oleh ciri penyembuhannya (Sarfarz Ahmed & Othman 2013; Nordin et al. 2017; White et al. 1963). Madu mempunyai kesan perlindungan terhadap penyakit gastrousus (Abdel-Latif 2015; Amaral et al. 2017). Beberapa kajian penyelidikan madu juga telah mengesahkan sifat-sifat biologi, seperti anti-oksidan, antiradang, antibakteria, anti-virus, anti-ulser dan antihiperlipidemia, anti-diabetik dan anti-kanser (Erejuwa et al. 2011; Kishore et al. 2011; Yaacob et al. 2017). Keistimewaan madu telah dinyatakan menerusi firman Allah di dalam kitab-Nya al-Quran dengan menamakan satu surah dengan nama lebah, (Al-Nahl) yang bermaksud “Dan Tuhanmu mengilhamkan kepada lebah; Hendaklah engkau membuat sarangmu di gunung-ganang, dan di pokok-pokok kayu, dan juga di bangunan-bangunan yang didirikan oleh manusia. Kemudian makanlah dari segala jenis bunga-bunga dan buah-buahan (yang engkau sukai), serta turutlah jalan-jalan peraturan Tuhanmu yang diilhamkan dan dimudahkannya kepadamu”. (Dengan itu) akan keluarlah dari dalam badannya minuman (madu) yang berlainan warnanya, yang mengandungi penawar bagi manusia (dari berbagai-bagai penyakit). Sesungguhnya pada yang demikian itu, ada tanda (yang membuktikan kemurahan Allah) bagi orang-orang yang mahu berfikir ” (QS An-Nahl: 68-69). Nabi Muhammad Sallallahu Alaihi Wasallam (S.A.W) juga menyarankan pengambilan madu hadis sahih yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari dan Imam Muslim untuk tujuan penyembuhan dari penyakit pada 1400 tahun yang lalu (HR Bukhari dan Muslim).

Madu adalah pemanis semula jadi yang boleh didapati secara meluas di seluruh dunia dan mengandungi kira-kira 200 daripada sebatian kimia (Ramanauskiene et al. 2012). Madu lebah adalah cecair likat yang mengandungi pelbagai molekul, termasuk

fruktosa dan glukosa (80 – 85%), air (15 – 17%), abu (0.2%), protein dan asam amino (0.1-0.4%) dan beberapa enzim, vitamin dan bahan-bahan lain, seperti sebatian berfenol (Patricia et al. 2015). Walau bagaimanapun, komposisi dan sifat-sifat fizikokimia madu adalah pembolehubah yang bergantung kepada sumber bunganya (Chen et al. 2000). Madu sering dinamakan mengikut lokasi geografi di mana madu tersebut dihasilkan, sumber madu bunga atau pokok-pokok di mana sarang ditemui contohnya madu Tualang yang berasal dari sarang lebah yang dibina pada pokok Tualang (*Kompassia excelsa*) (Lusby et al. 2002; Mohamed et al. 2010). Walau bagaimanapun, hampir semua madu di seluruh dunia mengandungi sama jenis asid fenolik, termasuk caffeik, ellagik, asid ferulik dan p coumaric; flavonoid seperti apigenin, chrysin, galangin, hesperetin, kaempferol, pinocembrin dan quercetin; dan antioksidan, tokoferol, asid askorbik, SOD, CAT dan *reduced* GSH. Setiap konstituen madu mempunyai sifat-sifat pemakanan dan ubat-ubatan yang unik, dan komponen-komponen yang bertindak secara sinergistik, menjadikan madu mudah digunakan dalam pelbagai aplikasi (Patricia et al. 2015).



Rajah 2.5

Struktur kimia flavonoid, asid organik, dan bahan-bahan fenolik yang terdapat dalam madu
Sumber daripada (Samarghandian et al. 2017)

2.5.1 Kesan Antibakteria Aktiviti Pada Madu

Aktiviti antibakteria adalah sangat penting secara terapeutik, terutamanya dalam keadaan di mana tindakbalas imun badan tidak mencukupi untuk menghapuskan jangkitan bakteria. Pada masa ini, ramai penyelidik telah melaporkan aktiviti antibakteria madu dan mendapati bahawa madu semula jadi yang tidak dipanaskan mempunyai beberapa aktiviti antibakteria berspektrum luas apabila diuji terhadap bakteria patogenik, bakteria oral serta bakteria perosak makanan (Kwakman et al. 2010; Lusby et al. 2005). Kesan antibakteria madu boleh dibahagikan kepada komponen peroksida dan bukan peroksida (Molan 2009). Komponen peroksida adalah berdasarkan aktiviti hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida dikawal oleh dua enzim penting dalam madu, iaitu oksida glukosa dan katalase. Glukosa oksida mendorong penghasilan hidrogen peroksida, manakala katalase akan memusnahkan hidrogen peroksida untuk pra penyajian kandungan nutrien dalam madu (Zainol et al. 2013). Hidrogen peroksida akan meningkatkan pengeluaran sitokin sebagai tindakbalas keradangan untuk membunuh bakteria (Tan et al. 2009; Vandamme et al. 2013).

Komponen-komponen bukan peroksida adalah berdasarkan fitokimia, kandungan gula yang tinggi dan keasidan madu. Komponen fitokimia dalam madu yang menyumbang kepada kesan antibakteria adalah flavonoid, bahan-bahan fenolik dan antibakteria peptida (Mandal & Mandal 2011). Komponen ini boleh bertindak dengan menghalang terus fagositosis, sekali gus menghalang radikal bebas super-oksida daripada merosakkan tisu-tisu. Komponen bukan peroksida yang tinggal adalah keasidan dalam madu yang disebabkan oleh asid organik. Asid ini, yang merangkumi 0.57% daripada madu itu sendiri, akan menyekat sebahagian besar mikroorganisma yang tumbuh pada pH 7.2 hingga 7.4 (Koochak et al. 2010).

2.5.2 Kesan Antioksidan Aktiviti Pada Madu

Kehadiran radikal bebas dan ROS amat penting dalam proses disfungsi selular, patogenesis penyakit metabolik dan kardiovaskular serta penuaan. Pengambilan makanan dan bahan yang kaya dengan antioksidan boleh melindungi daripada perubahan patologi ini dan seterusnya menghalang patogenesis keradangan kronik.

Kajian telah melaporkan bahawa madu mengandungi beberapa bahan penting dan ini termasuk terutamanya antioksidan (Sarfraz Ahmed et al. 2018; Inoue et al. 2005). Komposisi kualitatif dan kuantitatif madu (termasuk unsur anti-oksidan dan bahan-bahan fitokimia lain) mencerminkan sumber bunga serta kepelbagaian terhadap madu tertentu (Abdulwahid Ajibola et al. 2012; Abu Bakar et al. 2017). Dengan ini, saintis mula meneroka cara untuk meningkatkan aras antioksidan dalam badan melalui makanan tambahan dan menyedari bahawa madu boleh menjadi salah satu pilihan terbaik yang membekalkan antioksidan yang boleh mengambil radikal bebas dalam badan (Al-Hatamleh et al. 2020; Keng, Haron, Talib, et al. 2017).

Banyak kajian telah membuktikan bahawa madu boleh berfungsi sebagai sumber antioksidan semulajadi untuk mengurangkan risiko penyakit jantung, kanser, kekurangan sistem imun, katarak, proses keradangan yang berbeza dan sebagainya (Nweze et al. 2019; Samarghandian et al. 2017). Madu mengandungi sebatian antioksidan yang signifikan seperti asid fenolik, flavonoid, vitamin dan enzim (Meda et al. 2005; Ngoi et al. 2016). Di antara semua, polifenol telah menarik minat yang paling utama dalam kajian kerana fungsinya. Polifenol boleh bertindak sebagai kedua-dua penghapus sisa radikal dan modulator imun kerana ia mengandungi mobiliti hidrogen yang tinggi dalam struktur molekul (Havsteen 2002; Sousa et al. 2016). Kajian pada tahun 2012, menunjukkan bahawa terdapat korelasi yang tinggi antara polifenol dan kapasiti antioksidan, mencadangkan bahawa sebatian fenolik dan flavonoid adalah antioksidan utama yang terdapat dalam madu (Alzahrani et al. 2012). Selain itu, asid fenolik yang merupakan salah satu komponen utama di kalangan polifenol dalam madu, boleh menjejaskan rasa dan warna madu (Alvarez-Suarez et al. 2010). Menariknya, ini telah dibuktikan dalam kajian terdahulu menunjukkan bahawa terdapat korelasi antara warna dan kapasiti antioksidan, dengan madu yang lebih gelap menyediakan aras antioksidan yang lebih tinggi (Mandal & Jaganathan 2009). Kajian oleh Kek et al. pada tahun 2014 turut menunjukkan bahawa madu Kelulut dari spesies *Trigona* mempunyai aras kandungan fenolik dan intensiti warna yang lebih tinggi daripada madu Kelulut dari spesies *Apis*. Korelasi yang kukuh dan positif diperhatikan antara jumlah kandungan fenolik dan intensiti warna pada sampel madu Kelulut (*Trigona* dan *Apis*) menunjukkan madu dengan warna yang lebih gelap mengandungi jumlah kandungan fenolik yang lebih tinggi (Kek et al. 2014).

2.5.3 Kesan Antiradang Aktiviti Pada Madu

Walaupun hakikat bahawa keradangan adalah bahagian kritikal tindakbalas biasa terhadap jangkitan atau tisu yang rosak, apabila ia dalam keadaan ekstrem atau tertunda, ia boleh menghalang penyembuhan atau bahkan menyebabkan kemudaratan. Hasil keradangan yang paling serius adalah pengeluaran radikal bebas dalam tisu. Radikal-radikal yang hadir ini dimulakan oleh leukosit spesifik yang dirangsang sebagai aspek utama proses keradangan, kerana proses keradangan yang mengaktifkan siri proses selular yang mendakan '*precipitate*' pada permulaan faktor pertumbuhan yang mempengaruhi proliferasi fibroblas, angiogenesis, dan sel epitelium (Aziz et al. 2013).

Kesan antiradang madu lebah adalah disebabkan oleh kandungan fenolik yang tinggi. Sebatian fenolik dan flavonoid yang terdapat pada madu boleh menghalang pembebasan sitokin pro-keradangan, iNOS, pengeluaran ROS, dan mengurangkan aras prostaglandin (PG), salah satu fungsi utama dalam proses keradangan (Al-Waili & Boni 2003; Candiracci et al. 2012; Viuda-Martos et al. 2008). Menurut kajian *in-vivo* oleh Owoyele et al. (2011), madu menyebabkan perencatan penghasilan NO dalam keradangan akut dan kronik. Selanjutnya, kajian menggunakan madu Gelam dalam sistem model keradangan akut menggunakan tikus menunjukkan pengurangan edema. Mekanisme ini dikaitkan dengan perencatan *cyclooxygenase-2* (COX-2) dan iNOS, yang mengakibatkan penahanan aras pengantara pro-keradangan seperti NO, PGE₂, TNF- α , dan IL-6, dengan cara melemahkan translokasi nuklear faktor kappa B (NF- κ B) kepada nukleus dan dengan cara ini menghalang inisiasi laluan NF- κ B. Pengaktifan NF- κ B merupakan fungsi utama dalam patogenesis keradangan (Hussein et al. 2012, 2013).

2.6 MADU TUALANG

Madu Tualang terhasil daripada lebah Tualang (*Apis dorsata*) yang membina sarang di dahan pokok hutan Tualang yang tinggi (*Kompassia excelsa*). Pokok ini didapati dengan banyak di hutan hujan tropika dan boleh mencecah sehingga 250 kaki tinggi. Pokok-pokok ini didapati terutamanya di wilayah utara-barat Semenanjung Malaysia (Erejuwa et al. 2010). Sarang lebah Tualang boleh mencecah sehingga enam kaki dan

boleh menampung lebah sebanyak 30 000. Lebih daripada 100 sarang boleh ditemui pada satu pokok Tualang. Sebatang pokok boleh menghasilkan 450 kg madu Tualang. Madu Tualang mempunyai penampilan coklat gelap dan ia mengandungi kompaun polifenol yang menyumbang kepada aktiviti antioksidan yang tinggi (Mohamed et al. 2010).



Rajah 2.6

Pokok Tualang (*Kompassia excelsa*)
Sumber dari Anon. (2016)

2.6.1 Komposisi dan Sifat-Sifat Fisikokimia Madu Tualang

Madu Tualang (MT) terdiri daripada fruktosa (38%), glukosa (31%) dan lain-lain. Ia mengandungi lebih daripada 180 bahan, termasuk asid amino, vitamin, mineral dan enzim (Pérez et al. 2002; Terrab et al. 2003). Komposisi yang berbeza-beza mengikut sumber bunga dan asal-usul (Lusby et al. 2002). Ia mempunyai pH sebanyak 3.55-4.00 dan graviti 1.335. MT adalah lebih berasid daripada madu tempatan Malaysia yang lain, seperti Kelulut Hitam, Kelulut Putih dan Gelam. Ciri-ciri ini menjadikan MT berkesan terhadap beberapa mikroorganisma patogenik (Ghazali 2009). MT mengandungi lebih asid fenolik dan flavonoid daripada madu tempatan yang lain. Sebanyak enam fenolik asid (asid Gaul, syringic, benzoik, trans-cinnamic, p-coumaric dan caffeik) dan lima flavonoid (catechin, kaempferol, naringenin, luteolin dan apigenin) terdapat di MT (Kishore et al. 2011).

2.7 MADU KELULUT

Lebah tidak bersengat adalah lebah yang kecil dari spesies *Trigona* atau *Meliponine*. Nama madu Kelulut ini di ambil dari nama lebah Kelulut (tidak bersengat) yang terdapat di negara Malaysia dan Indonesia (Biswa et al. 2017; Harjanto et al. 2020). Lebah tidak bersengat adalah pendebunga utama di antara lebah yang lain dan boleh dijumpai di kawasan tropika dan subtropika (Fowler 1979). Madu lebah tidak bersengat adalah berbeza dengan apa yang dihasilkan oleh lebah genus *Apis* (iaitu lebah madu) dari segi warna, rasa dan kelikatan (de Almeida-Muradian et al. 2014; Guerrini et al. 2009). Warna madu Kelulut (MK) biasanya jernih, cair dan mempunyai rasa yang manis dan masam (Roowi et al. 2012). Dalam kajian terbaru menunjukkan bahawa madu lebah tidak bersengat mempunyai potensi untuk merawat kanser kolorektum (Yazan et al. 2016), anti-radang (Borsato et al. 2014), antimikrob (Cruz et al. 2014; Medeiros et al. 2016; Zainol et al. 2013) dan mempunyai satu sifat antioksidan (da Silva et al. 2013).



Rajah 2.7

Sarang lebah tidak bersengat (*Trigona* atau *Meliponine*)
Sumber dari Anon. (2020)

2.7.1 Komposisi dan Sifat-Sifat Fisikokimia Madu Kelulut

Konstituen kimia madu lebah tidak bersengat mengandungi kira-kira 200 kompaun, seperti vitamin, enzim, asid amino dan mineral, dengan kandungan utama air dan gula (Ávila et al. 2018). Fruktosa adalah yang paling lazim, terdiri 32-38% daripada jumlah gula dalam madu. Sebagai tambahan kepada fruktosa dan glukosa, beberapa yang lain

seperti disakarida dan oligosakarida, termasuk sukrosa, maltose, maltotriose dan panose, juga boleh didapati. Asid organik, mineral dan unsur surih seperti kalsium, kalium, sodium, magnesium, fosforus, sulfur, besi, zink, kuprum dan mangan adalah komponen-komponen lain yang terdapat dalam madu (Keng et al. 2017; Tewari & Irudayaraj 2004). Di samping itu, terdapat pelbagai vitamin, termasuklah asid askorbik (Vitamin C) thiamin (Vitamin B1), asid pantothenic (Vitamin B5), riboflavin (Vitamin B2), asid nikotinik (Vitamin B3), pyridoxine (Vitamin B6), biotin (Vitamin B8), asid folik (Vitamin B9) dan cyanocobalamin (Vitamin B12) (Ciulu et al. 2011). Enzim dan protein adalah konstituen kecil dalam madu, dengan enzim yang memainkan peranan penting dalam pelbagai aktiviti, termasuk aktiviti antimikrobial dan memudahkan penyerapan kalsium (Ariefdjohan et al. 2008). Banyak kajian telah melaporkan kapasiti antioksidan madu yang bergantung bukan sahaja berkaitan dengan kehadiran jumlah sebatian fenolik tetapi juga berkaitan dengan kehadiran flavanoid yang memainkan peranan penting dalam membaik pulih tekanan oksidatif (Escriche et al. 2014; Flores et al. 2015). Quercetin merupakan salah satu bahan yang terdapat dalam flavonoid yang banyak diambil dalam diet pemakanan manusia dan ia dianggap berfungsi sebagai antioksidan yang mujarab (Anand David et al. 2016).

BAB III

KAEDAH KAJIAN

3.1 BAHAN

3.1.1 Haiwan Kajian

Tikus putih jantan jenis Sprague Dawley yang mempunyai berat badan permulaan antara 200-250 g (usia dua bulan) telah digunakan dalam kajian ini. Tikus diperoleh daripada Unit Haiwan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Kaedah pengendalian haiwan telah diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC) dengan nombor kelulusan FAR/PP/2016/AZLINA/28-SEPT./78 6-OCT.-2016-OCT.-2019.

3.1.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan di dalam kajian ini disenaraikan seperti berikut:

- a. Penyediaan Kultur Bakteria, Ujian Suseptibiliti Antibakteria Kepada Strain *H. pylori***
 - i. Plat *Columbia Blood Agar* (CBA), (Oxoid, United Kingdom)
 - ii. Plat *Mueller Hinton Blood Agar* (MHBA), (Oxoid, United Kingdom)
 - iii. *Mueller Hinton Broth* (MHB), (Oxoid, United Kingdom)

b. Penyediaan Makanan Haiwan Kajian

- i. Makanan rodent komersial (Gold Coin, Malaysia)

c. Rawatan Haiwan Kajian

- i. Terapi piawai tiga serangkai yang merangkumi dua antibiotik (Clarithromycin dan Amoxicillin) dan satu PPI (Omeprazole)
- ii. Madu Tualang (MT) and madu Kelulut (MK) (FAMA, Malaysia)

d. Persampelan Darah dan Tisu

- i. Anestetik ketamine 100 mg/mL (Troy Laboratories Pty. Ltd., Australia)
- ii. Anestetik Xylazine 20 mg/mL (Indian Immunologicals Ltd., India)
- iii. Larutan formaldehid 37% (Merk KGaA, Jerman)

e. Pengukuran Asid Gaster

- i. NaOH (Merck, Germany)
- ii. Fenofalein (Sigma, Amerika Syarikat)
- iii. Etanol (Merck, Germany)

f. Pengukuran Enzim Katalase (CAT)

- i. Kit Asai (Elabsience, China)

g. Pengukuran Enzim Superoksida Dismutase (SOD)

- i. Kit Asai (Elabsience, China)

h. Pengukuran Enzim Glutation Peroksidase (GPX)

- i. Kit Asai (Elabsience, China)

i. Pengukuran Produk Pemperoksidaan Lipid, Melondialdehid (MDA)

- i. Kit Asai (Elabscience, China)

j. Pengukuran Nitrik Oksida (NO)

- i. Natrium nitrit (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat)
ii. Reagen Griess (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat)

k. Pengukuran Sitokin Interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p, Interferon- γ (IFN- γ), Faktor Nekrosis Tumor- α (TNF- α), dan Faktor Pertumbuhan Vaskular Endotelium (VEGF)

- i. Kit multipleks, (RECYTMAG-65k-04 Rat mengembang sitokin magnet Millipore, Watford, United Kingdom)

l. Pemprosesan dan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E)

- i. Larutan etanol 100% (HmBG Chemicals, Malaysia)
ii. Larutan toluena (Merk KGaA, Jerman)
iii. Parafin (Sigma-Aldrich, Amerika Syarikat)
iv. Hematoksilin (BDH Chemicals, United Kingdom)
v. Eosin (BDH Chemicals, United Kingdom)

3.1.3 Alat Radas

Alat radas yang digunakan di dalam kajian ini disenaraikan seperti berikut:

a. Penempatan Haiwan Kajian

- i. Semua tikus disimpan dalam kitaran malam/hari biasa, dengan cahaya semula jadi untuk tempoh 10 jam (07:00 – 17:00 h) dengan akses kepada makanan dan air secara *ad libitum*. Tikus ditempatkan di dalam sangkar pernafasan individu '*Individually Ventilated Cage*' (IVC) (Techniplast,

UK) di bilik haiwan Makmal Pelbagai Guna, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia.

b. Penyediaan Makanan Haiwan

- i. Alat penimbang (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat)

c. Penentuan Berat Badan dan Pengambilan Diet Tikus

- i. Alat penimbang digital (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat)

d. Persampelan dan Pemprosesan Darah

- i. Tiub pengumpulan darah (BD, UK)
- ii. Tiub endof 1.5 mL (Eppendorf, Jerman)
- iii. Mesin pembuat ais Scotsman AF10 (Scotsman Ice System, Amerika Syarikat)
- iv. Mesin pengempap Appendorf 5804R (Eppendorf, Jerman)
- v. Mesin pengempap Microfuge 22R (Beckman Coulter, Amerika Syarikat)
- vi. Peti sejuk -70 °C Revco Puffer Hubbard (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat)

e. Pengukuran Enzim (CAT, SOD, GPX, MDA dan NO), dan Sitokin (IL-1 β), IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p, IFN- γ , TNF- α dan VEGF)

- i. Mikropipet 10 μ L, 100 μ L, dan 1000 μ L (Eppendorf, Jerman)
- ii. Tip mikropipet 10 μ L, 100 μ L, dan 1000 μ L (BT Lab, Malaysia)
- iii. Plat mikrotiter 96 telaga
- iv. Mesin pembaca plat multimod EnSpire (Perkin Elmer, Amerika Syarikat)
- v. Program perisian Enspire 4.1 (Perkin Elmer, Amerika Syarikat)
- vi. Mesin pembaca Magpix (Luminex Corp, Austin, TX, Amerika Syarikat)
- vii. Program perisian xPonent 4.2 (Luminex Corp, Austin, TX, Amerika Syarikat)

f. Penyediaan Blok Paraffin Tisu Gaster Bagi Pewarnaan H&E dan Giemsa

- i. Mesin pembenaman Leica EG1160 (Leica Microsystems, Jerman)
- ii. Acuan pembenaman (Leica Microsystems, Jerman)
- iii. Ketuhar (Mommert, Jerman)

g. Penyediaan Slaid Tisu Gaster

- i. Mesin mikrotom Leica RM2235 (Leica Microsystems, Jerman)
- ii. Plat pemanasan Leica H11220 (Leica Microsystems, Jerman)
- iii. Mandian air Leica H11211 (Leica Microsystems, Jerman)
- iv. Mata pisau mikrotom (Leica Microsystems, Jerman)
- v. Mata pisau kriostat (FEATHER, Jepun)
- vi. Slaid biasa (Sail brand, Cina)
- vii. Slaid bersalut polilisin Menzel-Glaser (Thermo Scientific, Jerman)
- viii. Penutup slaid bersaiz 18 x 18 mm (Chance Propper, UK)
- ix. Kotak slaid

h. Pewarnaan Histologi

- i. Bekas pewarnaan
- ii. Mikroskop cahaya Olympus CX31 (Olympus Corporation, Jepun)
- iii. Jam randik (Strato 7, Switzerland)

3.2 PENGENDALIAN TIKUS DAN PENYEDIAAN DIET

3.2.1 Pengendalian Tikus

Setelah menerima tikus daripada pembiak baka, tikus di asingkan secara individu ke dalam sangkar IVC dan diberi makanan dan minuman secara *ad libitum*. Keadaan dan berat tikus dipantau sepanjang proses aklimatisasi di dalam sangkar IVC selama dua minggu. Penyelidikan dimulakan setelah memastikan tikus dalam keadaan baik, dimana mereka mampu untuk makan dan minum secara bebas dan berat badan yang meningkat.

3.3 PENYEDIAAN RAWATAN

3.3.1 Madu Tualang dan Madu Kelulut

Madu Tualang dan madu Kelulut yang digunakan sebagai rawatan di dalam kajian ini dibekalkan dari Lembaga Pemasaran Pertanian Persekutuan (FAMA). Dalam kajian ini dos madu yang diberikan ialah 2.0 g/kg berat tikus berdasarkan kajian yang telah dilakukan oleh Nasuti et al. (2006) dan Almasaudi et al. (2016) yang dapat mengurangkan pembentukan lesi gaster. Bagi tikus yang mempunyai berat 300 g menggunakan kiraan (0.1 ml/100 g berat tikus), sebanyak 0.6 g madu Tualang atau madu Kelulut dilarutkan ke dalam 0.3 ml air suling untuk diberikan kepada seekor tikus sehari melalui gavaj oral.

3.3.2 Terapi Piawai Tiga Serangkai

Terapi piawai tiga serangkai merupakan rawatan pertama yang disyorkan bagi manusia (Chey et al. 2017) dan digunakan bagi tikus kumpulan positif dalam kajian ini yang merangkumi dua antibiotik iaitu Clarithromycin (500 mg) dan Amoxicillin (1000 mg) dan satu perencat pam proton iaitu Omeprazole (20 mg) yang telah dibekalkan oleh M.S. Ally Pharma (Malaysia) Sdn Bhd. Rawatan terapi piawai tiga serangkai diberi dua kali sehari selama 14 hari. Dos yang digunakan ke atas tikus dikira berdasarkan dos setara haiwan (AED) mengikut luas berat piawai manusia (BSA). Berikut adalah pengiraan yang dilakukan berdasarkan garis panduan oleh FDA (Food and Drug Administration 2005; Nair et al. 2018). Clarithromycin, Amoxicillin dan Omeprazole dilarutkan di dalam air suling dan diberikan kepada tikus melalui oral gavaj. Pengiraan bagi dos haiwan adalah berdasarkan persamaan di bawah:

$$\text{Dos Setara Haiwan (AED)} = \text{Dos Manusia (mg/kg)} \times \frac{\text{Km Manusia}}{\text{Km Tikus}}$$

Nilai Km adalah diambil berdasarkan garis panduan FDA (2005)

- i. Pengiraan dos Clarithromycin (500 mg)
500 mg Clarithromycin dua kali sehari pada 60 kg berat piawai manusia dewasa adalah bersamaan:
= 8.33 mg/kg

$$\begin{aligned}
 \text{AED} &= 8.33 \text{ mg/kg} \times \frac{\text{Km Manusia}}{\text{Km Tikus}} \\
 &= 8.33 \text{ mg/kg} \times \frac{37}{6} \\
 &= 51.37 \text{ mg/kg}
 \end{aligned}$$

ii. Pengiraan dos Amoxicillin (1000 mg)

1000 mg Clarithromycin dua kali sehari pada 60 kg berat piawai manusia dewasa adalah bersamaan:

$$= 16.67 \text{ mg/kg}$$

$$\begin{aligned}
 \text{AED} &= 16.67 \text{ mg/kg} \times \frac{\text{Km Manusia}}{\text{Km Tikus}} \\
 &= 16.67 \text{ mg/kg} \times \frac{37}{6} \\
 &= 102.80 \text{ mg/kg}
 \end{aligned}$$

iii. Pengiraan dos Omeprazole (20 mg)

20 mg Clarithromycin dua kali sehari pada 60 kg berat standard manusia dewasa adalah bersamaan:

$$= 0.33 \text{ mg/kg}$$

$$\begin{aligned}
 \text{AED} &= 0.33 \text{ mg/kg} \times \frac{\text{Km Manusia}}{\text{Km Tikus}} \\
 &= 0.33 \text{ mg/kg} \times \frac{37}{6} \\
 &= 2.035 \text{ mg/kg}
 \end{aligned}$$

3.4 PENYEDIAAN EJEN ANESTETIK

Campuran ketamine 100 mg/mL, Xylazine 20 mg/mL digunakan sebagai ejen anestetik. Kedua-dua ubat ini dicampurkan pada nisbah 1:4. Sebanyak 2 mL Ketamine dan 6 mL Xylazine (dicampurkan ke dalam 2ml air suling) bagi penyediaan stok. Agen anestetik diberikan secara suntikan melalui intramuskular pada dos 0.2 ml pada setiap 100 g berat badan tikus.

3.5 PERSAMPELAN DARAH TIKUS

Sampel darah tikus diambil pada minggu ke-lapan kajian dijalankan. Sampel darah diperoleh melalui tebuk kardium (*cardiac puncture*) dan tikus dipengsan terlebih dahulu dengan menggunakan agen anestetik. Sebanyak 2 mL darah untuk setiap 100 g berat tikus boleh di ambil pada setiap satu prosedur pengambilan darah dijalankan. Darah dikumpulkan ke dalam tiub pengumpulan darah dan dibiarkan pada suhu bilik selama dua jam sebelum tiub diempar pada kelajuan 3000 rpm selama 10 minit pada suhu bilik. Serum yang terpisah diambil dan dipindahkan ke dalam tiub endof dan disimpan pada suhu -70 °C sehingga analisis dijalankan.

3.6 PENGORBANAN HAIWAN KAJIAN

Pada akhir kajian, tikus dikorbankan secara beretika dengan suntikan dos berlebihan agen anestetik Ketamine dan Xylazine. Darah, dan tisu gaster diambil dan disimpan pada suhu -70°C sehingga analisis dijalankan.

3.7 REKA BENTUK KAJIAN

3.7.1 Kultur Bakteria *H. pylori*

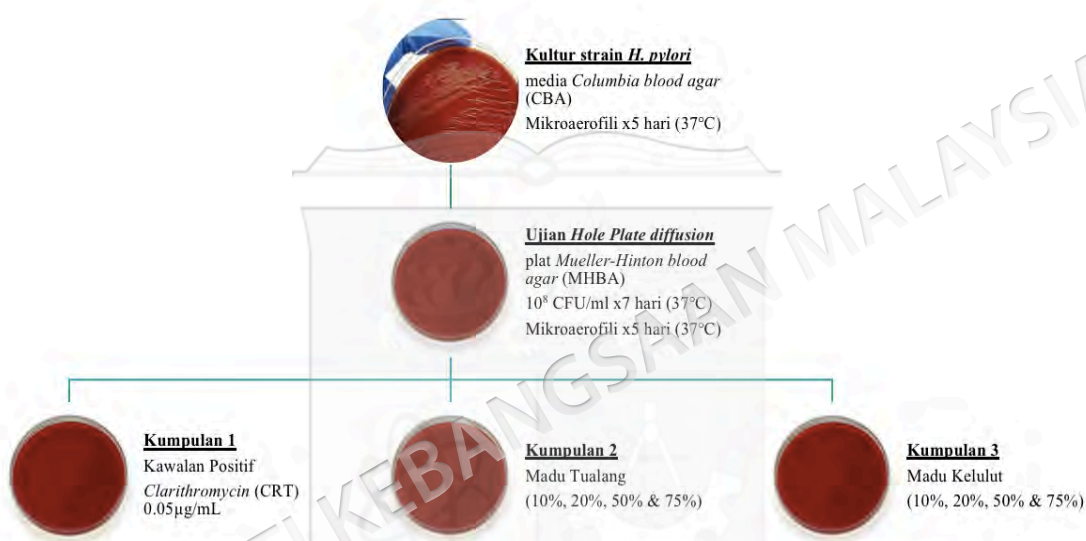
Kultur strain *H. pylori* disediakan daripada stok kultur di Jabatan Mikrobiologi, UKM. Bakteria *H. pylori* dikultur ke atas CBA dan dieram dalam keadaan mikroaerofilik selama 5 hari pada 37°C. Pertumbuhan koloni dikenalpasti melalui pewarnaan Gram dan ujian urease.

3.7.2 Kajian *In-Vitro*

a. Ujian Suseptibiliti Antibiotik Ke Atas Strain *H. pylori*

Ujian suseptibiliti antibakteria ke atas strain *H. pylori* menggunakan kaedah ujian *Hole Plate diffusion* (Dastouri et al. 2008; Christy Echakachi Manyi-Loh et al. 2013). Aktiviti kepekatan MT dan MK (10 %, 20 %, 50 % dan 75 %) diuji ke atas strain *H. pylori*. Inokulum *H. pylori* disediakan dalam MHB dan disadur ke plat MHBA dalam tiga arah

yang berbeza menggunakan swab steril. Lubang berukuran lapan mm diameter telah di tebuk pada MHBA menggunakan pengorek keluli nirkarat yang steril dan kemudiannya dipenuhi dengan 80 mL madu Tualang dan madu Kelulut secara berasingan kepada setiap satu kepekatan madu (10 %, 20 %, 50 % dan 75 %). Plat MHBA dieram dalam keadaan mikroaerofilik pada 37 °C selama tujuh hari. Aktiviti antimikrob dinilai dengan mengukur zon perencatan antibiotik. Setiap ujian dilakukan sebanyak tiga kali. Antibiotik Clarithromycin digunakan sebagai kawalan ubat piawai. Ringkasan reka bentuk kajian ditunjukkan pada Rajah 3.1.



Rajah 3.1

Reka bentuk kajian *in-vitro*

3.7.3 Kajian *In-Vivo*

Tikus putih '*Sprague Dawley*' jantan yang digunakan dalam kajian ini dibahagikan kepada lima kumpulan dengan jumlah enam ekor tikus setiap kumpulan berdasarkan diet dan rawatan yang diberikan. Kumpulan-kumpulan tersebut ialah: (1) kawalan normal (diet standard); (2) kawalan negatif (teraruh jangkitan *H. pylori*); (3) kawalan positif (terapi piawai tiga serangkai); (4) rawatan kajian MT dan (5) rawatan kajian MK. Inokulum *H. pylori* dengan kepekatan 10⁸ CFU/ml diberikan kepada tikus kumpulan 2, 3, 4 dan 5 melalui oral gavaj sebanyak satu ml/ rat dua kali sehari selang empat jam selama tujuh hari berturut-turut (Werawatganon 2014) dan dibiarkan selama empat minggu untuk membentuk lesi gaster. Setelah itu, semua rawatan bagi kumpulan 3, 4, dan 5 diberikan dua kali sehari selang lapan jam selama 14 hari berturut-turut. Air suling

digunakan sebagai larutan untuk madu dan standard terapi tiga serangkai diberikan melalui oral gavaj dengan menggunakan jarum yang bersaiz 18 G. Kumpulan 1 dan 2 yang tidak menerima rawatan juga menerima air suling sebagai kawalan. Tikus ditempatkan secara berasingan (seekor tikus dalam satu sangkar) di dalam IVC, bersuhu 25 ± 2 °C dengan kelembapan relatif 72 RH dan kitaran cahaya gelap (10 jam:14 jam). Tikus diberi kebebasan untuk mengambil makanan secara *ad libitum* sehingga pengukuran parameter dilakukan. Pada hari akhir rawatan, tikus akan dipuasakan selama 24 jam sebelum dikorbankan pada minggu ke lapan. Ringkasan reka bentuk kajian ditunjukkan pada Rajah 3.2.

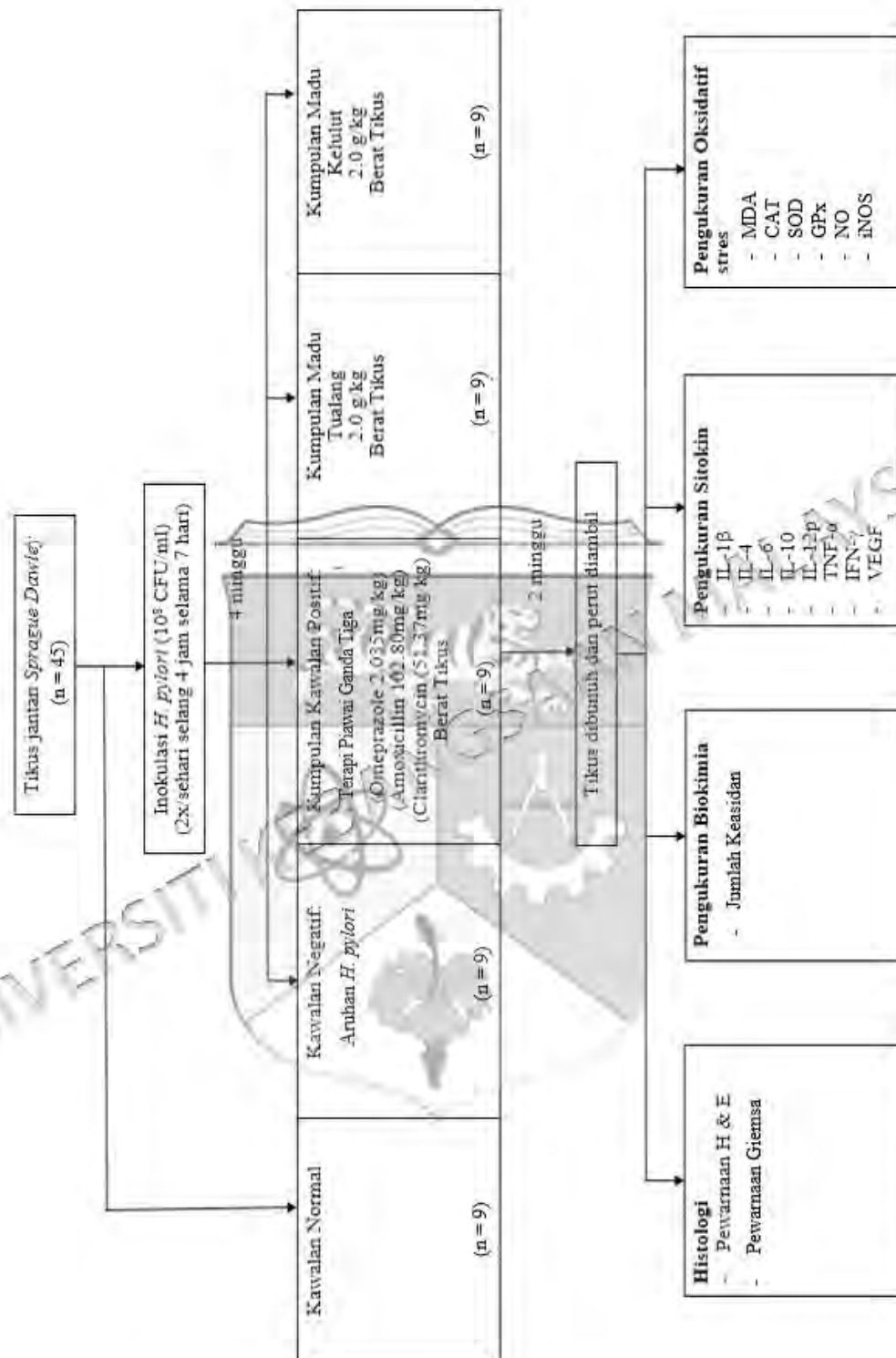
3.8 PENGUKURAN PARAMETER FIZIKAL

3.8.1 Pengambilan Diet

Tikus diberi akses kepada diet secara *ad libitum*. Baki makanan ditimbang dengan alat penimbang elektronik digital untuk menentukan pengambilan makanan. Bekalan air bersih yang mencukupi diberikan kepada tikus dan ditukar pada setiap minggu.

3.8.2 Berat Badan

Berat badan setiap ekor tikus ditentukan pada awal kajian dan setiap minggu sepanjang kajian dijalankan dengan menggunakan alat penimbang digital. Perubahan sifat fizikal dan pertumbuhan tikus diperhatikan di sepanjang kajian.



Rajah 3.2

Reka bentuk kajian *in-vivo*

3.9 PENENTUAN PARAMETER KAJIAN

3.9.1 Pengukuran Asid Gaster

Setelah tikus dikorbankan, abdomen tikus dibuka dan bahagian sempadan esofagus-gaster dan duodenum-pilorus dikenalpasti dan diikat sebelum gaster dipotong keluar. Kemudian 3 ml air suling disuntikkan ke dalam gaster dan dikocak. Bahagian yang diikat dipotong dan jus gaster diambil. Jus gaster yang diperoleh diemparkan pada kelajuan 1500 x g (4°C) selama 10 minit. Sebanyak 1 ml supernatan diambil dan dicampurkan dengan 9 ml air suling (10 kali pencairan). Seterusnya, tiga titik penunjuk fenoftalein 0.5% dititiskan dan campuran dititratkan dengan larutan NaOH 0.01 M sehingga larutan menjadi warna merah jambu, menunjukkan larutan mempunyai pH 7. Isipadu titratan digunakan untuk pengiraan kepekatan ion hidrogen (H^+) mengikut kaedah Shay et al. (1954).

3.9.2 Aras enzim katalase (CAT) pada tisu gaster

Aras enzim CAT diukur menggunakan kit ELISA CAT (Elabscience, China). Penyediaan larutan-larutan reagen dan langkah-langkah asai dijalankan mengikut arahan yang terdapat pada kit ELISA yang digunakan (Lampiran B). Intensiti warna produk yang terhasil diukur pada gelombang 240 nm di atas mesin pembaca plat multimod EnSpire (Perkin Elmer, USA) menggunakan program perisian Enspire 4.1 (Perkin Elmer, USA). Keputusan dinyatakan sebagai perbandingan aras CAT diantara kumpulan pada akhir kajian dijalankan.

3.9.3 Aras enzim Superoksida Dismutase (SOD) pada tisu gaster

Aras enzim SOD diukur menggunakan kit ELISA SOD (Elabscience, China). Penyediaan larutan-larutan reagen dan langkah-langkah asai dijalankan mengikut arahan yang terdapat pada kit ELISA yang digunakan (Lampiran D). Intensiti warna produk yang terhasil diukur pada gelombang 450 nm di atas mesin pembaca plat multimod EnSpire (Perkin Elmer, USA) menggunakan program perisian Enspire 4.1

(Perkin Elmer, USA). Keputusan dinyatakan sebagai perbandingan aras SOD diantara kumpulan pada akhir kajian dijalankan.

3.9.4 Aras enzim Glutation Peroksidase (GPx) pada tisu gaster

Aras enzim GPx diukur menggunakan kit ELISA GPX (Elabscience, China). Penyediaan larutan-larutan reagen dan langkah-langkah asai dijalankan mengikut arahan yang terdapat pada kit ELISA yang digunakan (Lampiran E). Intensiti warna produk yang terhasil diukur pada gelombang 340 nm di atas mesin pembaca plat multimod EnSpire (Perkin Elmer, USA) menggunakan program perisian Enspire 4.1 (Perkin Elmer, USA). Keputusan dinyatakan sebagai perbandingan aras GPX diantara kumpulan pada akhir kajian dijalankan.

3.9.5 Aras enzim pemperoksidaan lipid, melondialdehid (MDA) pada tisu gaster

Aras produk pemperoksidaan lipid, MDA diukur menggunakan kit Asai MDA (Elabscience, China). Penyediaan larutan-larutan reagen dan langkah-langkah asai dijalankan mengikut arahan yang terdapat pada kit Asai yang digunakan (Lampiran F). Intensiti warna produk yang terhasil diukur pada gelombang 532 nm di atas mesin pembaca plat multimod EnSpire (Perkin Elmer, USA) menggunakan program perisian Enspire 4.1 (Perkin Elmer, USA). Keputusan dinyatakan sebagai perbandingan aras MDA diantara kumpulan pada akhir kajian dijalankan.

3.9.6 Aras enzim Nitrik Oksida (NO) dan Nitrik Oksida Sintase Teraruh (iNOS) pada tisu gaster

Penghasilan NO ditentukan secara tidak langsung dengan mengukur kandungan metabolit NO_2^- dalam tisu gaster. Untuk menghasilkan larutan stok NaNO_2 dengan kepekatan 100 μM , sebanyak 6.9 mg serbuk NaNO_2 ditambah ke dalam 1 L air suling. Kepekatan NO_2^- tisu gaster ditentukan daripada lengkung piawai '*standard curve*' yang diperolehi dengan kepekatan bermula dari 2.5 μM ke 100 μM larutan NaNO_2 (Jadual 3.1). Larutan piawai disediakan dengan menggunakan larutan stok NaNO_2 dan dimasukkan ke dalam tiub ependof secara berasingan, kemudian ditambahkan air suling untuk menjadikan isipadu akhir sebanyak 100 μL .

Jadual 3.1 Kepekatan larutan piawai natrium nitrit

Kepekatan (μM)	Larutan stok (μL)	Isipadu air suling (μL)
2.5	2.5	97.5
5.0	5.0	95
10	10	90
20	20	80
40	40	60
60	60	40
80	80	20
100	100	0

Sebanyak 50 μL sampel dan larutan piawai nitrit masing-masing dimasukkan ke dalam telaga-telaga pada plat mikrotiter diikuti dengan 50 μL reagen Griess dan di inkubasi selama 15 minit. Produk berwarna yang dihasilkan adalah berkadar dengan kuantiti NO_2^- yang hadir dalam sampel. Intensiti warna produk yang terhasil diukur pada gelombang 540 nm di atas mesin pembaca plat multimod EnSpire. Keputusan dinyatakan sebagai perbandingan aras NO diantara kumpulan pada akhir kajian dijalankan.

Manakala bagi iNOS, tisu gaster disimpan dalam $-80\text{ }^\circ\text{C}$ dan kemudian RNA diekstrak oleh penyucian spin-column (Vivantis, Malaysia.). Primer rawak digunakan untuk mensintesis cDNA mengikut arahan pengilang (ABM good, Kanada). PCR dilakukan menggunakan langkah awal denaturasi pada $95\text{ }^\circ\text{C}$ selama dua minit, dengan 40 kitaran amplifikasi pada $95\text{ }^\circ\text{C}$ selama 15 saat dan penyepuhlindungan (*annealing*) pada $58\text{ }^\circ\text{C}$ hingga $60\text{ }^\circ\text{C}$ (bergantung kepada urutan primer) selama 30 saat. Ekspresi relatif dikira mengikut rujukan beta actin.

3.9.7 Aras Sitokin (IL-1b), (IL-4), (IL-6), (IL-10), (IL-12p), (TNF), (IFN- γ), dan (VEGF) Pada Tisu Gaster

Aras sitokin dalam sampel tisu gaster ditentukan oleh analisis manik multiplek, (RECYTMAG-65k-04 Rat mengembang sitokin magnet *Millipore*, Watford, UK). Aras molekul-molekul berikut yang telah diukur: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p, TNF- α , IFN- γ dan VEGF. Penyediaan larutan-larutan reagen dan langkah-langkah asai dijalankan mengikut arahan yang terdapat pada manual kit yang digunakan (Lampiran G). Setiap satu sampel tisu gaster (50 μL) telah dieram semalaman dengan salutan

antibodi tangkap manik yang di bawah agitasi pada 4 °C. Selepas mencuci, manik dieram lagi dengan Biotin-berlabel sitokin antibodi anti-manusia selama 60 minit, diikuti dengan inkubasi *streptavidin-phycoerythrin* selama 30 minit. Akhirnya, manik telah dibasuh dan dianalisis dalam pembaca Magpix (Luminex Corp, Austin, TX, Amerika Syarikat) di Prima Nexus Sdn Bhd. Data disimpan dan dianalisis menggunakan perisian Xponent 4.2. Keputusan dinyatakan sebagai perbandingan aras sitokin IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p, TNF- α , IFN- γ dan VEGF di antara kumpulan pada akhir kajian dijalankan.

3.10 PEMROSESAN TISU GASTER DAN PEWARNAAN HEMATOKSILIN & EOSIN DAN GIEMSA

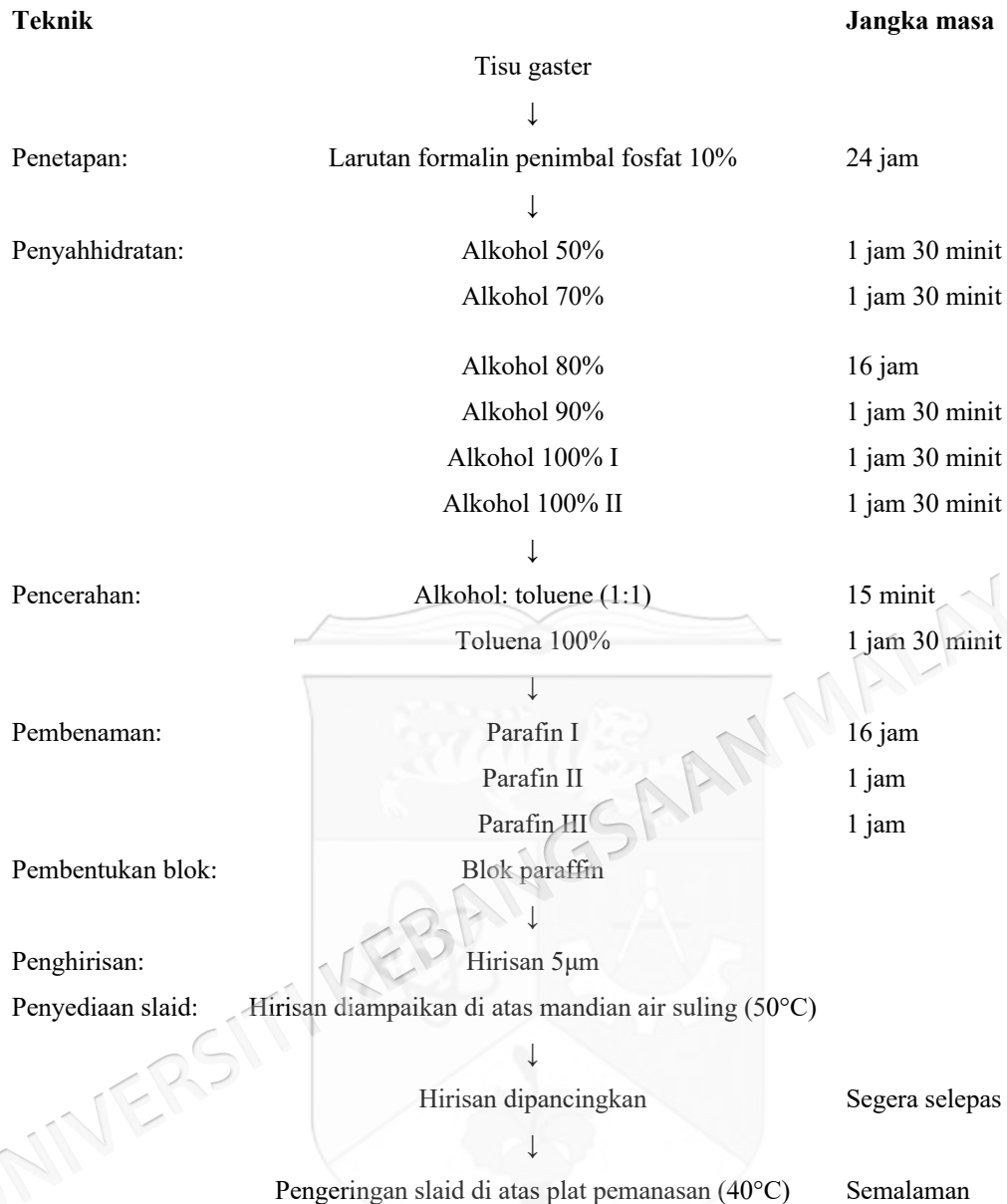
3.10.1 Pemprosesan Tisu Gaster

Selepas kajian tamat pada minggu ke lapan, kesemua tikus dikorbankan dan tisu gaster dikeluarkan dan dibersihkan. Kemudian, tisu gaster diawet dengan larutan formalin penimbal fosfat 10% selama 24 jam. Selepas itu, proses penyahidratan dilakukan dengan merendam dengan merendam tisu gaster ke dalam larutan alkohol 50% dan 70% secara berturutan selama satu jam setengah bagi setiap larutan alkohol. Kemudian, tisu gaster dimasukkan ke dalam larutan alkohol 80% selama 16 jam. Pada keesokan hari, proses diteruskan dengan larutan alkohol 90% selama satu jam setengah. Tisu gaster seterusnya direndamkan ke dalam larutan alkohol 100% selama satu jam setengah sebanyak dua kali pertukaran selama satu jam setengah bagi setiap pertukaran. Proses pembersihan '*clearing*' dilakukan dengan merendamkan tisu gaster ke dalam larutan alkohol:toluena (1:1) selama 15 minit. Selepas itu, tisu gaster direndamkan ke dalam larutan toluena 100% selama satu setengah jam.

Pemprosesan diteruskan dengan proses pembenaman '*infiltration*'. Tisu gaster dimasukkan ke dalam kaset dan direndamkan ke dalam cecair lilin parafin paraplas di dalam ketuhar bersuhu 60°C selama 16 jam. Pada keesokan hari, kaset yang mengandungi tisu gaster dipindahkan ke dalam cecair lilin parafin paraplas kedua dan ketiga dengan setiap kali pertukaran selama satu jam. Selepas itu, proses pembentukan blok dilakukan. Tisu gaster diletakkan secara menegak di dalam acuan pembenaman yang berisi lilin parafin. Lilin parafin dibiarkan membeku di atas permukaan ais

sebelum acuan pembenaman dikeluarkan. Blok tisu terhasil dan sedia untuk dihiris. Blok tisu disimpan pada suhu 0°C sehingga proses penghirisan dilakukan.

Tisu gaster dihiris pada ketebalan 5µM dengan menggunakan mesin mikrotom. Blok tisu dipastikan supaya sejuk untuk memudahkan proses penghirisan. Seterusnya, hirisan riben lilin diampaiakan di atas air suling bersuhu 50°C. Hirisan riben dipancing dari permukaan air menggunakan slaid kaca dengan dua keratan tisu gaster setiap slaid. Hirisan riben dipastikan tidak diampaiakan terlalu lama di atas air suling untuk mengelakkan hirisan tersebut daripada terpecah. Slaid yang terhasil dikeringkan pada rak dan kemudian dibiarkan kering di atas plat pemanasan bersuhu 40°C semalaman. Bahagian bawah slaid dipastikan supaya kering sebelum diletakkan di atas plat pemanasan untuk dikeringkan selama semalaman. Slaid yang terhasil disimpan di dalam kotak slaid sehingga proses pewarnaan dilakukan. Rajah 3.3 menggambarkan carta alir kaedah pemprosesan tisu gaster bagi pewarnaan hematoksilin dan eosin.



Rajah 3.3 Carta alir kaedah pemprosesan tis gaster dan penyediaan slaid histologi

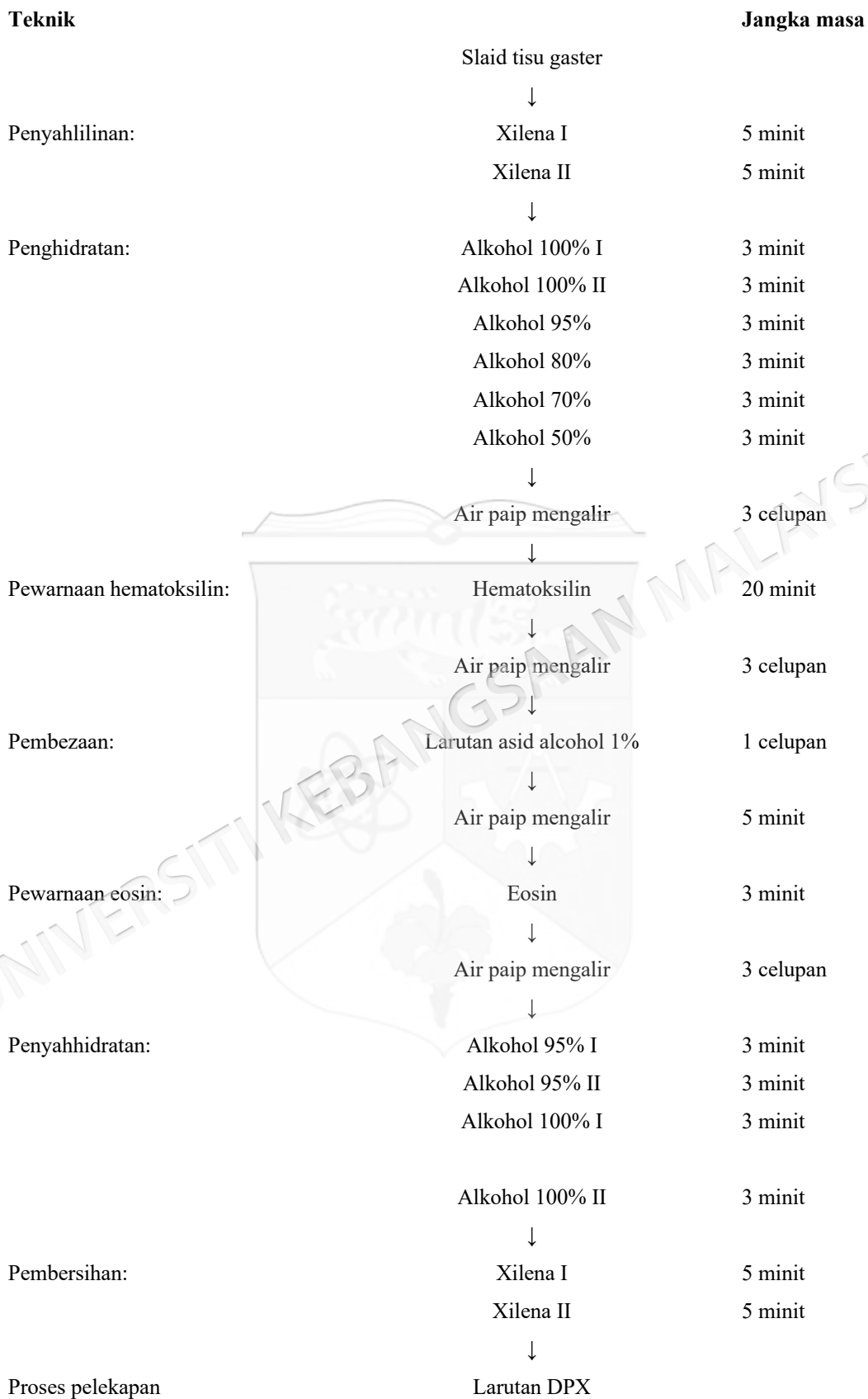
3.10.2 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E)

Pewarnaan H&E pada tis gaster sering dilakukan dalam kajian mikroskopi. Pewarnaan dimulakan dengan proses penyahhilinan. Slaid tis gaster direndamkan di dalam larutan xilena 100% sebanyak dua kali pertukaran selama lima minit setiap pertukaran. Kemudian proses penghidratan dengan meletakkan slaid tis gaster ke dalam larutan alkohol 100% I, 100% II, 95%, 80%, 70% dan 50% secara berurutan selama tiga minit bagi setiap larutan alkohol. Slaid tis gaster seterusnya dicelupkan ke dalam air paip

mengalir sebanyak tiga kali. Selepas itu, slaid tisul direndamkan di dalam larutan pewarna hematoksilin selama 20 minit. Setelah tamat tempoh, slaid tisul kemudian dicelupkan ke dalam larutan asid alkohol 1% sebanyak satu kali untuk proses pembezaan. Selepas itu, slaid tisul direndamkan di dalam larutan pewarna eosin selama tiga minit. Slaid tisul kemudiannya dicelupkan kembali ke dalam air paip mengalir sebanyak tiga kali.

Kemudian, proses penyahhidratan dilakukan dengan merendamkan slaid tisul di dalam larutan alkohol 95% dan 100% sebanyak dua kali pertukaran setiap jenis kepekatan secara berurutan selama tiga minit setiap kali pertukaran. Seterusnya, proses pembersihan dilakukan dengan meletakkan slaid tisul gaster ke dalam larutan xilena 100% sebanyak dua kali pertukaran selama lima minit bagi setiap pertukaran. Akhirnya, proses pelekapan dilakukan dengan slaid tisul gaster ditutup dengan penutup slaid yang dititiskan dengan larutan *dibutylphthalate polystyrene xylene* (DPX). Gelembung udara dipastikan supaya tidak terperangkap di bawah penutup slaid. Slaid tisul dibiarkan pada suhu bilik semalaman.

Pemeriksaan mikroskopi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX31 (Olympus Corporation, Jepun) pada kanta mata aras pembesaran 10X dan kanta objektif pada aras pembesaran 4X, 10X, 20X dan 40X. Penentuan morfometri gaster dilakukan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX53 (Olympus Corporation, Jepun) dan kamera warna Olympus DP27 (Olympus Corporation, Jepun) dengan menggunakan program perisian penganalisa imej cellSens (CellSens, Belanda). Rajah 3.4 menggambarkan carta alir kaedah pewarnaan H&E.



Rajah 3.4

Carta alir pewarnaan histologi H&E

3.10.3 Skor Ekspresi Lesi Mukosa Gaster

Gambar foto tisu gaster yang diwarnakan dengan H&E dirakamkan (format JPEG, warna 24-bit, 2560x1920 piksel) dengan menggunakan kamera MicroPublisher 5.0 RTV yang disambungkan ke mikroskop pada pembesaran 200x, dan 400x untuk melihat perubahan patologi pada mukosa gaster. Keseluruhan bahagian gaster mukosa dibahagikan kepada beberapa gambar. Sebanyak tiga bahagian gambar diambil pada setiap keratan tisu gaster. Skala gred pengkuantitian skor ekspresi lesi mukosa gaster adalah seperti Jadual 3.2. Skor dilakukan oleh dua orang penyelidik patologi yang dirabunkan mengikut sistem pemarkahan yang ditubuhkan oleh Dixon et al. (1996) dan Sakagami et al. (1996). Skor adalah seperti berikut:

Jadual 3.2 Aras kronik keradangan, aktiviti, dan perubahan atrofik pada mukosa gaster (Sakagami et al. 1996)

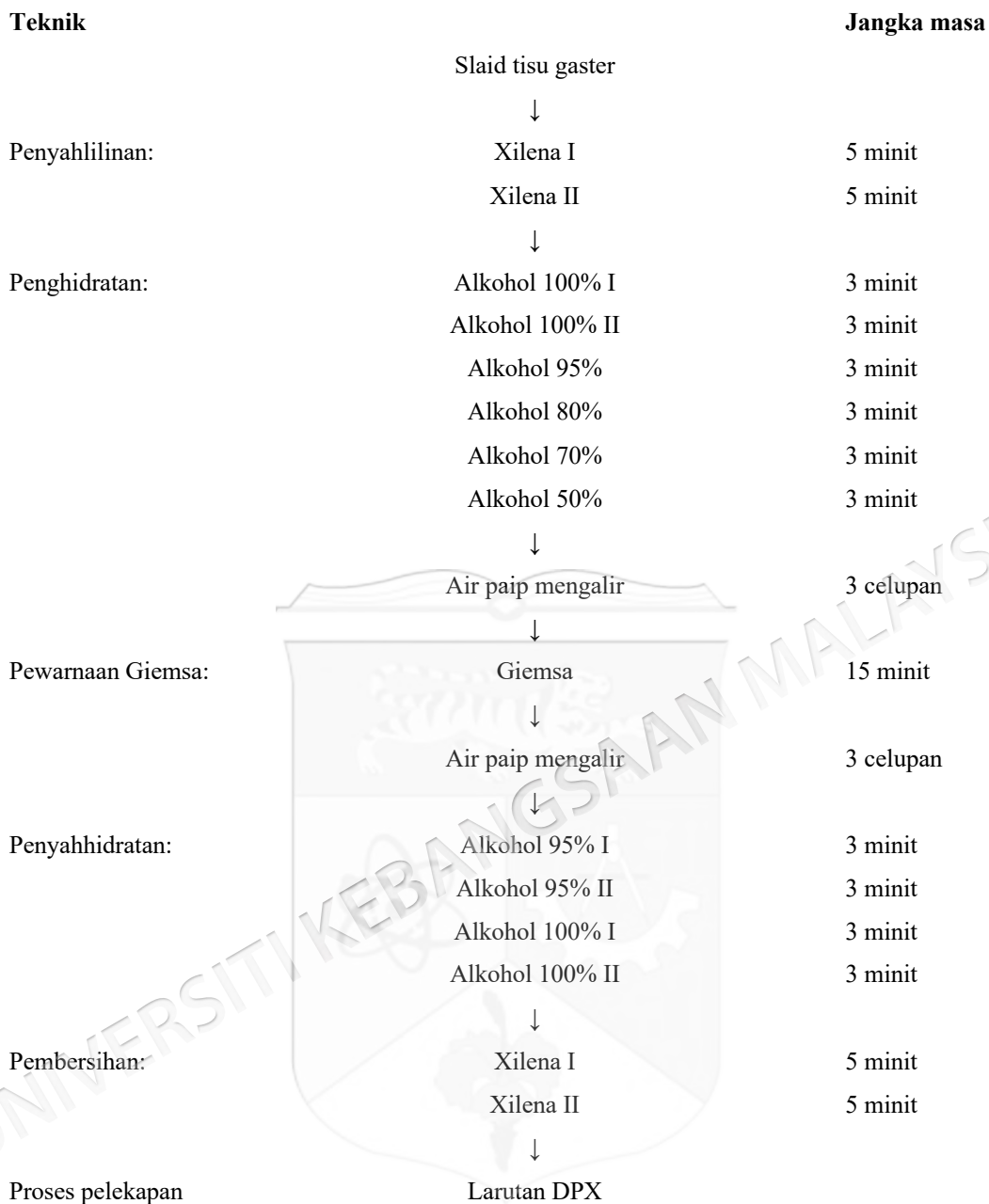
Gred	Kronik Keradangan	Aktiviti	Perubahan Atofik
0	Tiada peningkatan dalam sel keradangan	Tiada peningkatan dalam sel keradangan	Tiada kehilangan sel khusus
1	Tiada peningkatan dalam sel keradangan oleh limfosit, sel plasma, dan beberapa eosinofil	Neutrofil bertaburan dalam lamina propria tanpa <i>leucopedesis</i> di kawasan sumur gaster	Kehilangan ringan pada sel khusus dalam kelenjar (sel utama dan sel parietal)
2	Infiltrasi yang sederhana padat pada lamina propria oleh limfosit dan sel plasma	Bilangan neutrophil yang sederhana dalam lamina propria dengan mikroabsces di kawasan sumur gaster	Kehilangan sederhana pada sel khusus di kelenjar
3	Infiltrasi sel-sel <i>lymphoplasmic</i> yang sangat padat pada lamina propria	Neutrofil yang ekstensif dalam propria lamina dengan kriptitis yang jelas	Kehilangan yang teruk pada sel khusus di kelenjar

3.10.4 Pewarnaan Giemsa

Pewarnaan Giemsa adalah satu kaedah histologi untuk menunjukkan kehadiran dan lokasi *H. pylori* pada tisu gaster (C.-C. Fan et al. 2019; Gray et al. 1986). Pewarnaan dimulakan dengan proses penyahhilinan. Slaid tisu gaster direndamkan di dalam larutan xilena 100% sebanyak dua kali pertukaran selama lima minit setiap pertukaran. Kemudian proses penghidratan dengan meletakkan slaid tisu gaster ke dalam larutan alkohol 100% I, 100% II, 95%, 80%, 70% dan 50% secara berurutan selama tiga minit bagi setiap larutan alkohol. Slaid tisu gaster seterusnya dicelupkan ke dalam air paip mengalir sebanyak tiga kali. Selepas itu, slaid tisu direndamkan di dalam larutan pewarna Giemsa selama 15 minit. Setelah tamat tempoh, slaid tisu kemudiannya dicelupkan kembali ke dalam air paip mengalir sebanyak tiga kali. Kemudian, proses penyahhidratan dilakukan dengan merendamkan slaid tisu di dalam larutan alkohol 95% dan 100% sebanyak dua kali pertukaran setiap jenis kepekatan secara berurutan selama tiga minit setiap kali pertukaran. Seterusnya, proses pembersihan dilakukan dengan meletakkan slaid tisu gaster ke dalam larutan xilena 100% sebanyak dua kali pertukaran selama lima minit bagi setiap pertukaran. Akhirnya, proses pelekapan dilakukan dengan slaid tisu gaster ditutup dengan penutup slaid yang dititiskan dengan larutan DPX. Gelembung udara dipastikan supaya tidak terperangkap di bawah penutup slaid. Slaid tisu dibiarkan pada suhu bilik semalaman. Rajah 3.5 menggambarkan carta alir pewarnaan giemsa.

3.11 ANALISIS STATISTIK

Perisian SPSS versi 24.0 dan Graphpad Prism 6.07 digunakan bagi analisis statistik. Data terbahagi kepada kajian *in-vitro* dalam bentuk nilai purata $\pm$ sisihan piawai (SD) dan kajian *in-vivo* dalam bentuk nilai purata $\pm$ ralat piawai (SEM). Kenormalan data diuji menggunakan ujian *Shapiro Wilk*. Perbandingan data antara kumpulan-kumpulan kajian menggunakan kaedah varians (ANOVA) diikuti dengan ujian Tukey HSD untuk analisa parametrik, manakala ujian Kruskal Wallis dan ujian Dunnett digunakan untuk analisa bukan parametrik. Keputusan dianggap signifikan sekiranya $p < 0.05$.



Rajah 3.5

Carta alir pewarnaan histologi Giemsa

BAB IV

HASIL KAJIAN

4.1 KESAN MADU TUALANG (MT) DAN MADU KELULUT (MK) SEBAGAI ANTI-*H. PYLORI* AKTIVITI PADA UJIAN SUSEPTIBILITI ANTIMIKROB (AST)

Jadual 4.1 menunjukkan keputusan MT dan MK pada kepekatan yang berbeza (10 %, 20 %, 50 %, 75 % (v/v)) memberikan pelbagai aras aktiviti antibakteria terhadap bakteria *H. pylori* dari segi zon perencatan. MT dan MK pada kepekatan 75 % (v/v) menunjukkan zon perencatan tertinggi (15.14 ± 0.86 mm) dan (13.14 ± 1.85 mm) signifikan ($p < 0.05$) apabila dibandingkan dengan kepekatan-kepekatan yang lain. Dalam ujian ini, Clarithromycin (0.05 mg/ml) yang digunakan sebagai ubat piawai, menunjukkan zon perencatan jauh lebih tinggi daripada zon perencatan oleh MT dan MK dengan signifikan ($p < 0.0001$).

Jadual 4.1 Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) sebagai anti- *H. pylori* pada ujian suseptibiliti antimikrobial (AST)

Madu	Zon perencatan (mm)			
	10	20	50	75
Tualang	$6.36 \pm 1.30^{*cd}$	$8.38 \pm 1.96^{*d}$	$12.92 \pm 1.64^{*ab}$	$15.14 \pm 0.86^{*abc}$
Kelulut	$7.32 \pm 1.61^{*cd}$	$8.15 \pm 1.21^{*}$	$11.25 \pm 2.62^{*acf}$	$13.14 \pm 1.85^{*abefg}$
Clarithromycin	27 ± 0.33^{abcdefgh}			

Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ sisihan piawai ($n=3$)

* Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan CLR

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan TH 10%

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan TH 20%

^c Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan TH 50%

^d Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan TH 75%

^e Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan KH 10%

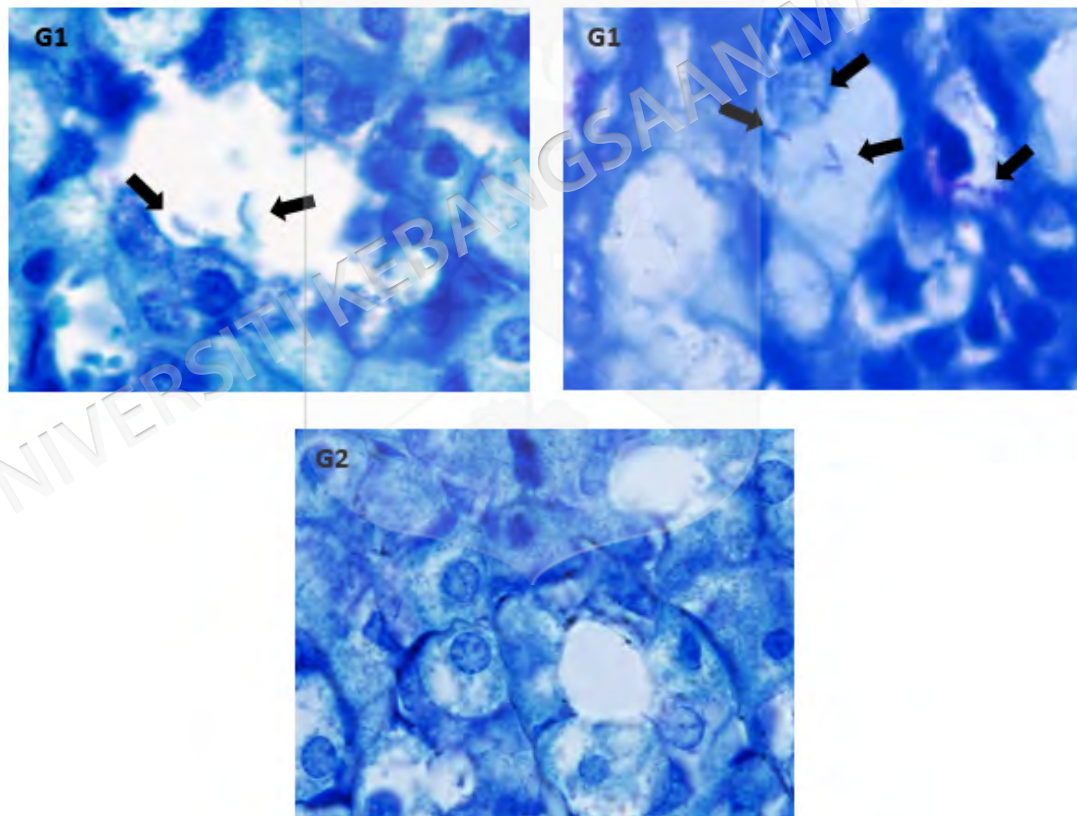
^f Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan KH 20%

^g Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan KH 50%

^h Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan KH 75%

4.2 KAJIAN MIKROSKOPIK TISU GASTER: PEWARNAAN GIEMSA

Fotomikrograf 4.1 menunjukkan pemeriksaan histologi pengesanan bakteria *H. pylori* menggunakan pewarnaan giemsa dengan kadar pembesaran 100x (10 μ m) bagi kumpulan kawalan normal dan kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) pada minggu terakhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif menunjukkan kolonisasi bakteria *H. pylori* di kelenjar mukosa antrum gaster berbanding dengan kumpulan kawalan normal.



Fotomikrograf 4.1

Pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan Giemsa bagi kumpulan (G1) Kawalan Normal; (G2) Kawalan Negatif
100x (10 μ m)

Anak panah hitam menunjukkan kehadiran bakteria *H. pylori* dalam kelenjar mukosa antrum gaster

4.3 KAJIAN MIKROSKOPIK TISU GASTER: PEWARNAAN H&E

Fotomikrograf 4.2, 4.3 dan 4.4 menunjukkan pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan H&E dengan kadar pembesaran 10x (100µm), 20x (50µm) dan 40x (20µm) antara kumpulan kajian pada minggu terakhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan normal menunjukkan struktur histologi mukosa dan submukosal gaster yang normal dan utuh tanpa sebarang lesi. Manakala bagi kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan kecederaan mukosa gaster tikus yang meluas kepada permukaan epitelium yang disebabkan oleh jangkitan *H. pylori*. Walau bagaimanapun, rawatan kumpulan MT dan MK selama 14 hari menunjukkan perbaikan terhadap histologi permukaan epitelium yang lebih baik pada tikus dengan lesi gaster aruhan *H. pylori*, setanding dengan rawatan kumpulan positif terapi tiga serangkai (TT).

Pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan H&E telah ditafsirkan dalam bentuk skor lesi untuk setiap kumpulan dalam Jadual 4.2 Rawatan MK dengan signifikan ($p < 0.05$) mengurangkan histologi skor keradangan kronik dan aktiviti lesi gaster aruhan *H. pylori* berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Tiada perbezaan yang signifikan dilihat antara kumpulan rawatan MT dan TT berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*).

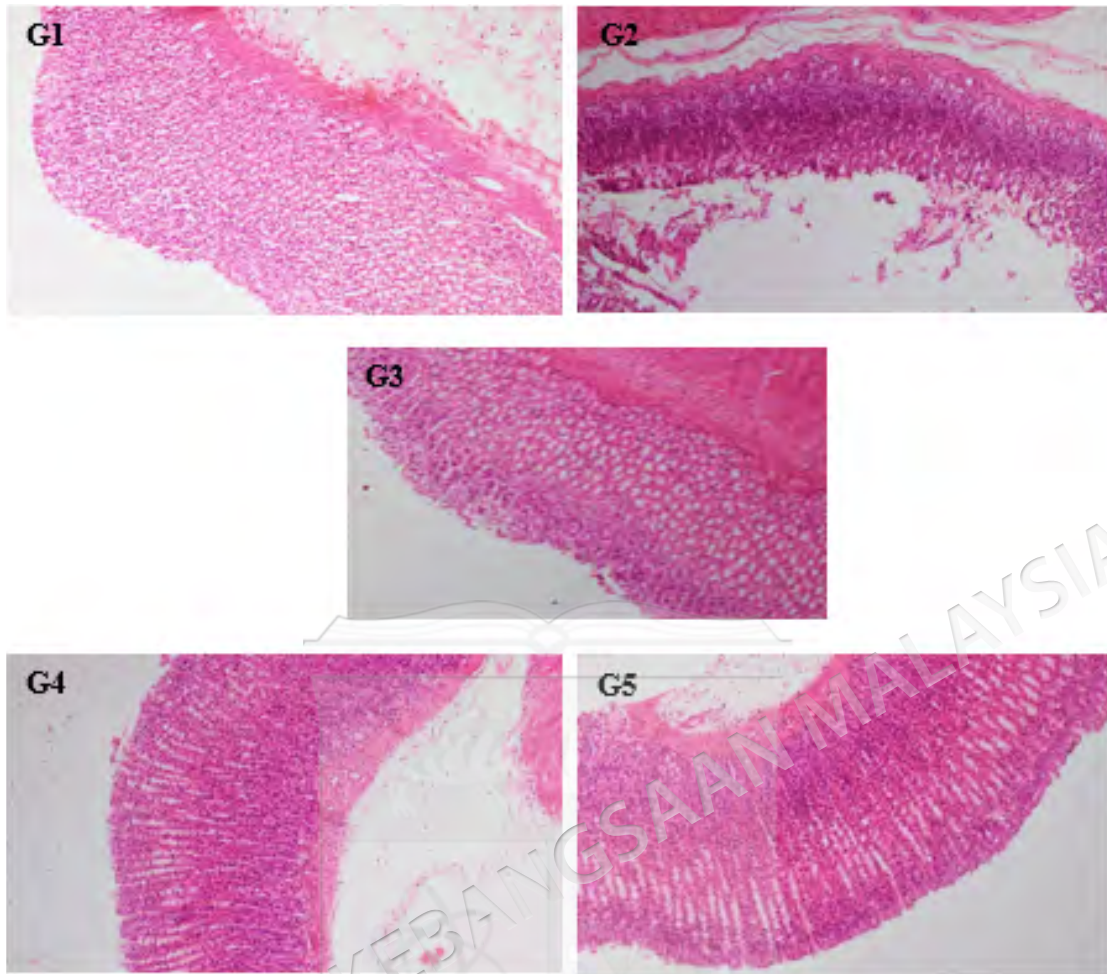
Jadual 4.2 Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas mukosa gaster pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*

Purata penggredan mukosa gaster (0-3)			
Kumpulan	Keradangan kronik	Aktiviti	Perubahan Atrofik
Kawalan Normal	0	0	0
Kawalan Negatif	1.7 ^a	1.7 ^a	1.4 ^a
Kawalan Positif	0.7	0.7	0.7
Madu Tualang	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a
Madu Kelulut	0.4 ^b	0.4 ^b	0.6

Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n=3$)

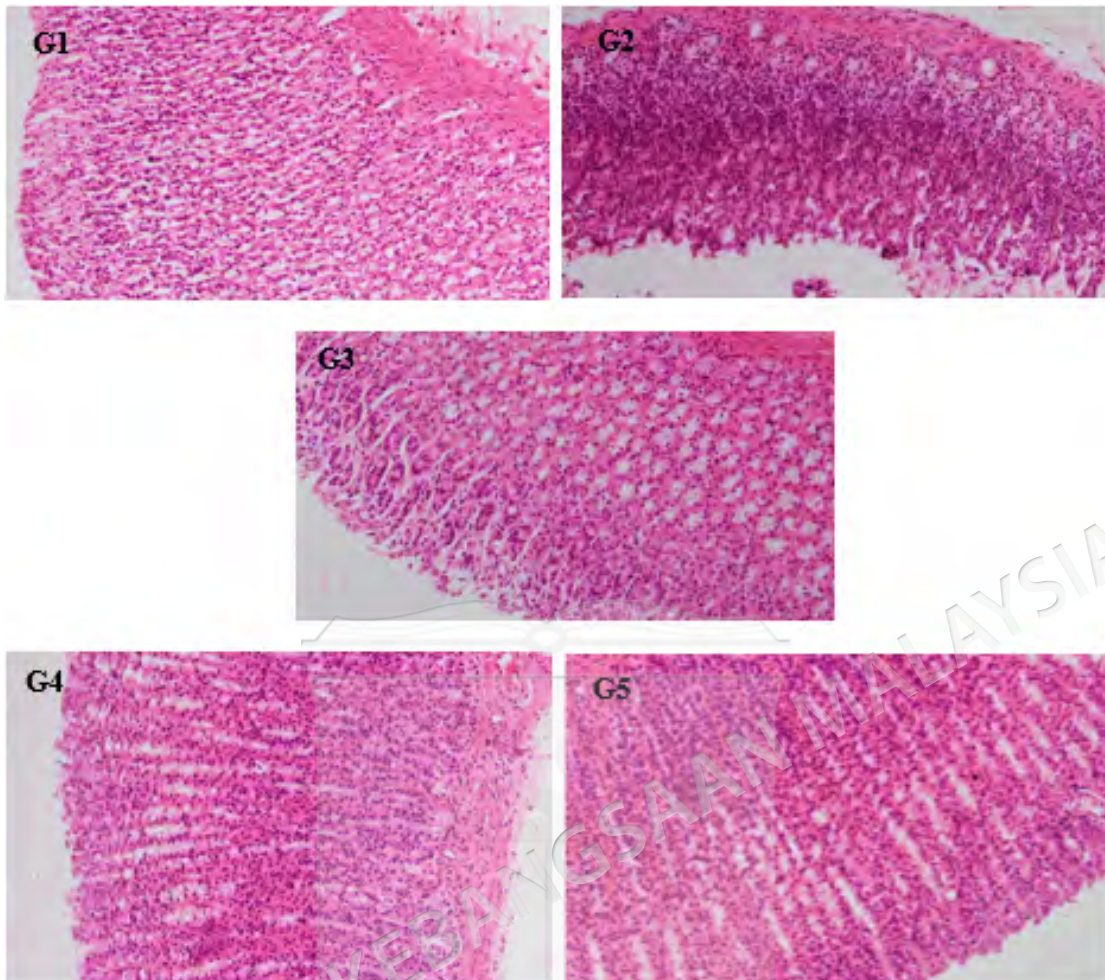
^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)



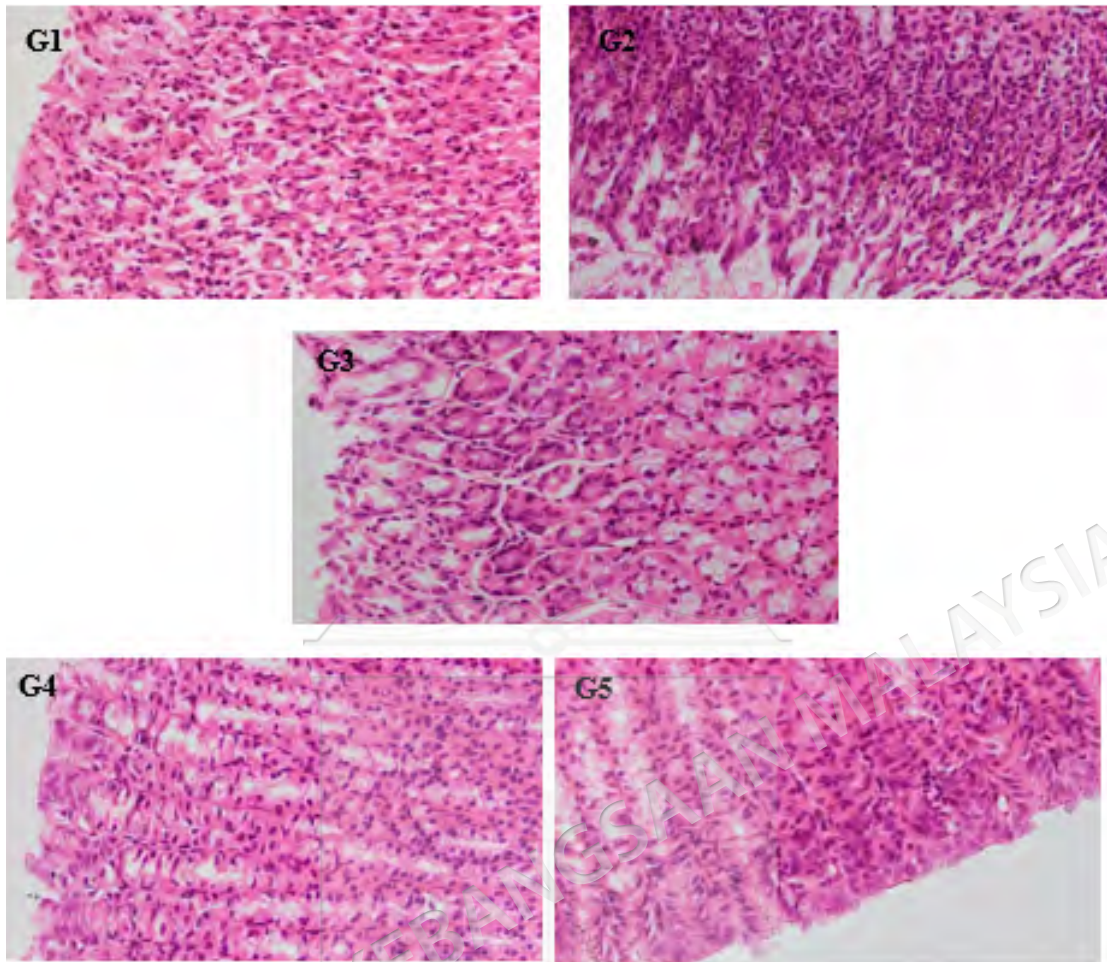
Fotomikrograf 4.2

Pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan H&E dari kumpulan (G1) Kawalan Normal; (G2) Kawalan Negatif; (G3) Rawatan Terapi Tiga Serangkai (TT); (G4) Rawatan Madu Tualang (MT); (G5) Rawatan Madu Kelulut (MK). 10x (100 μ m)



Fotomikrograf 4.3

Pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan H&E dari kumpulan (G1) Kawalan Normal; (G2) Kawalan Negatif; (G3) Rawatan Terapi Tiga Serangkai (TT); (G4) Rawatan Madu Tualang (MT); (G5) Rawatan Madu Kelulut (MK). 20x (50 μ m)

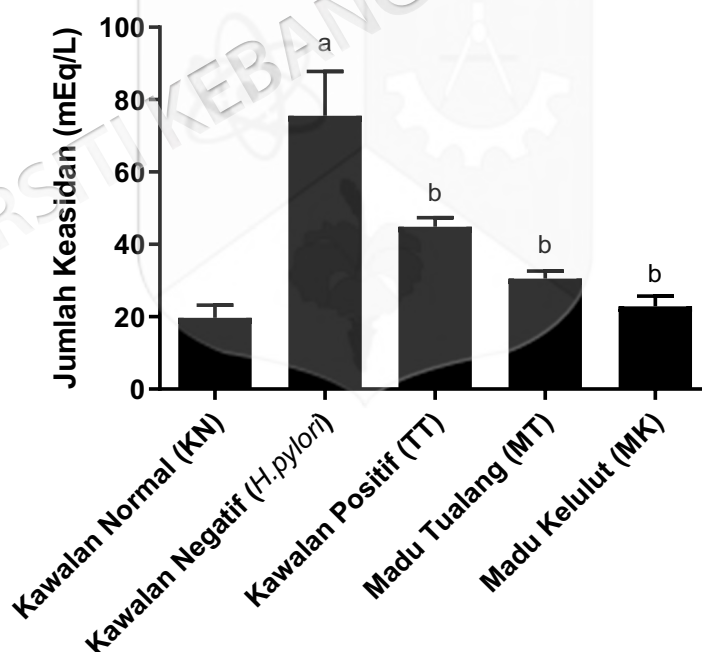


Fotomikrograf 4.4

Pemeriksaan histologi tisu gaster bagi pewarnaan H&E dari kumpulan (G1) Kawalan Normal; (G2) Kawalan Negatif; (G3) Rawatan Terapi Tiga Serangkai (TT); (G4) Rawatan Madu Tualang (MT); (G5) Rawatan Madu Kelulut (MK). 40x (20 μ m)

4.4 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS KEPEKATAN ASID GASTER DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.1 menunjukkan perbezaan pada kepekatan asid gaster antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan aras kepekatan asid gaster yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 74% ($p < 0.0001$) berbanding dengan kumpulan kawalan normal (KN). Kesemua kumpulan rawatan menunjukkan penurunan aras kepekatan asid gaster yang signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Rawatan MT dan MK mampu mengurangkan kepekatan asid gaster ke atas tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*, dengan penurunan masing-masing sebanyak 60% ($p = 0.0002$) dan 70% ($p < 0.0001$). Kumpulan rawatan TT juga menunjukkan penurunan yang signifikan sebanyak 41% ($p < 0.0001$). Tiada perbezaan yang signifikan dilihat antara kumpulan rawatan MT (30.500 ± 2.141 mEq/L) dan MK (22.830 ± 2.892 mEq/L) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (44.830 ± 2.509 mEq/L).



Rajah 4.1

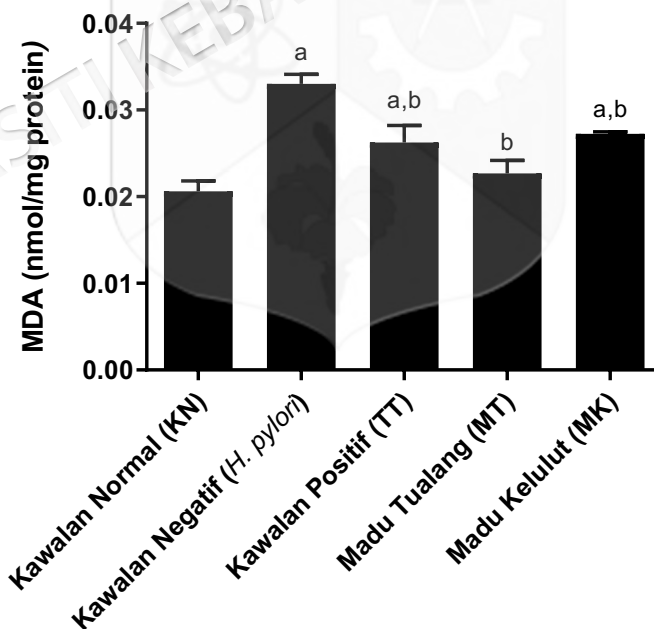
Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas kepekatan asid gaster pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n = 6$)

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

4.5 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS MALONDIALDEHID (MDA) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.2 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada kandunagn MDA tisu gaster antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan pada kandungan MDA yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 38% ($p < 0.0001$) berbanding dengan kumpulan kawalan normal (KN). Kesemua kumpulan rawatan berjaya menurunkan aras MDA yang signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Rawatan MT dan MK selama 14 hari dapat mengurangkan aras MDA kepada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*, dengan penurunan masing-masing sebanyak 31% ($p = 0.0001$) dan 17% ($p = 0.0389$). Kumpulan rawatan TT juga menunjukkan penurunan yang signifikan sebanyak 20% ($p = 0.0118$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Tiada perbezaan yang signifikan dilihat antara kumpulan rawatan MT (0.023 ± 0.002 nmol/mg) dan MK (0.027 ± 0.000 nmol/mg) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (0.026 ± 0.002 nmol/mg).



Rajah 4.2

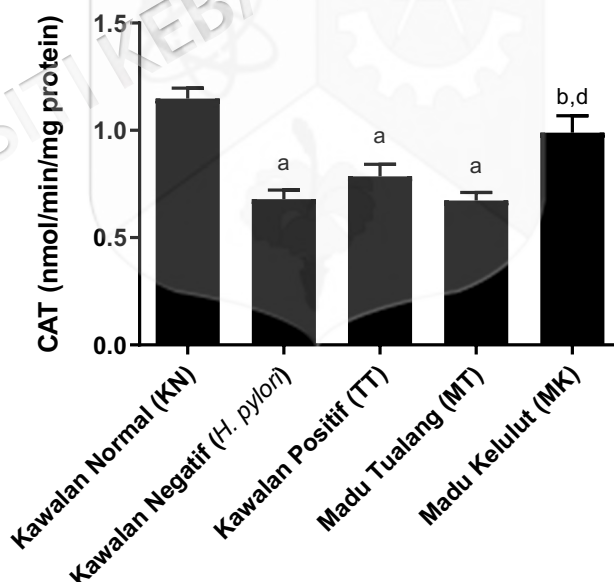
Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas MDA pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n = 6$)

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

4.6 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS KATALASE (CAT) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.3 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras enzim CAT antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan aras enzim CAT yang lebih rendah secara signifikan sebanyak 41% ($p < 0.0001$) berbanding dengan kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MK menunjukkan peningkatan aras enzim CAT yang signifikan sebanyak 31% ($p = 0.0042$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Tiada perubahan pada aras CAT ke atas kumpulan rawatan MT (0.673 ± 0.038 nmol/min/mg) dan TT (0.786 ± 0.056 nmol/min/mg) berbanding dengan kawalan negatif (*H. pylori*) (0.679 ± 0.043 nmol/min/mg). Dapatan kajian antara kumpulan rawatan selama 14 hari menunjukkan MK dapat meningkatkan aras enzim CAT dengan signifikan sebanyak 32% ($p = 0.0035$) berbanding kumpulan rawatan MT. Tiada perbezaan yang signifikan dilihat antara kumpulan rawatan MT (0.673 ± 0.038 nmol/min/mg) dan MK (0.989 ± 0.079 nmol/min/mg) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (0.786 ± 0.056 nmol/min/mg).



Rajah 4.3

Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas enzim CAT pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n = 6$)

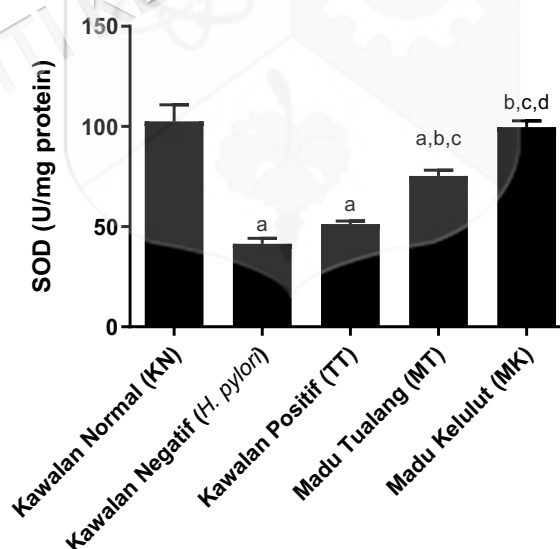
^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

^d Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan madu Tualang (MT)

4.7 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.4 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras enzim SOD antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan aras enzim SOD yang lebih rendah secara signifikan sebanyak 60% ($p < 0.0001$) berbanding dengan kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MK dan MT menunjukkan peningkatan aras enzim SOD yang signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*), dengan peningkatan masing-masing sebanyak 45% ($p = 0.0001$) dan 58% ($p < 0.0001$). Namun tiada perubahan pada aras enzim SOD pada kumpulan rawatan TT (51.330 ± 1.437 U/mg) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) (41.390 ± 2.772 U/mg). Dapatan kajian antara kumpulan rawatan selama 14 hari menunjukkan MT dan MK dapat meningkatkan aras enzim SOD kepada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*, dengan signifikan sebanyak 32% ($p = 0.0059$) dan 49% ($p < 0.0001$) berbanding kumpulan rawatan TT. Kumpulan rawatan MK mendahului dalam meningkatkan aras enzim SOD sebanyak 25% ($p = 0.0049$) berbanding kumpulan rawatan MT.



Rajah 4.4 Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas enzim SOD pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n = 6$)

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

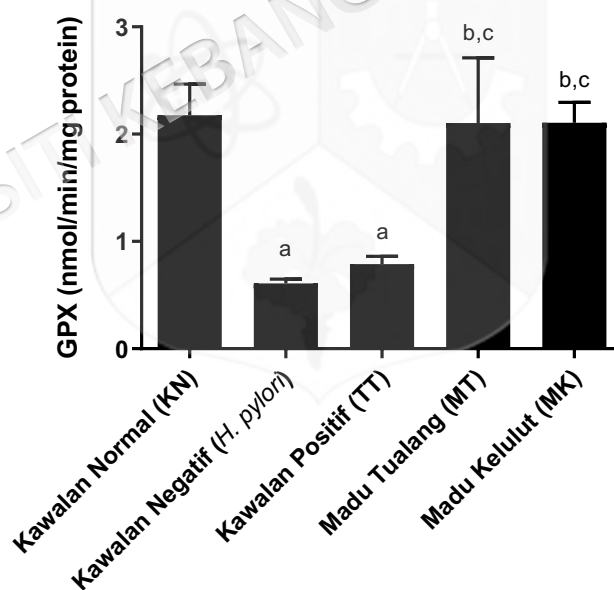
^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

^c Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan positif terapi tiga serangkai (TT)

^d Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan madu Tualang (MT)

4.8 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS GLUTATION PEROKSIDASE (GPX) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.5 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras enzim GPX antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan aras enzim GPX yang lebih rendah secara signifikan sebanyak 72% ($p=0.0135$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MK dan MT menunjukkan peningkatan aras enzim GPX yang signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*), dengan peningkatan masing-masing sebanyak 71% ($p=0.0198$) dan 71% ($p=0.0197$). Tiada perubahan pada aras enzim GPX pada kumpulan rawatan TT (0.789 ± 0.070 nmol/min/mg) berbanding dengan kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) (0.608 ± 0.041 nmol/min/mg). Dapatan kajian antara kumpulan rawatan selama 14 hari menunjukkan MT dan MK berjaya meningkatkan aras enzim GPX kepada tikus aruhan lesi gaster dijangkiti *H. pylori*, dengan signifikan sebanyak 62% ($p=0.0495$) dan 62% ($p=0.0491$) berbanding kumpulan rawatan TT.



Rajah 4.5

Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas enzim GPX pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n = 6$)

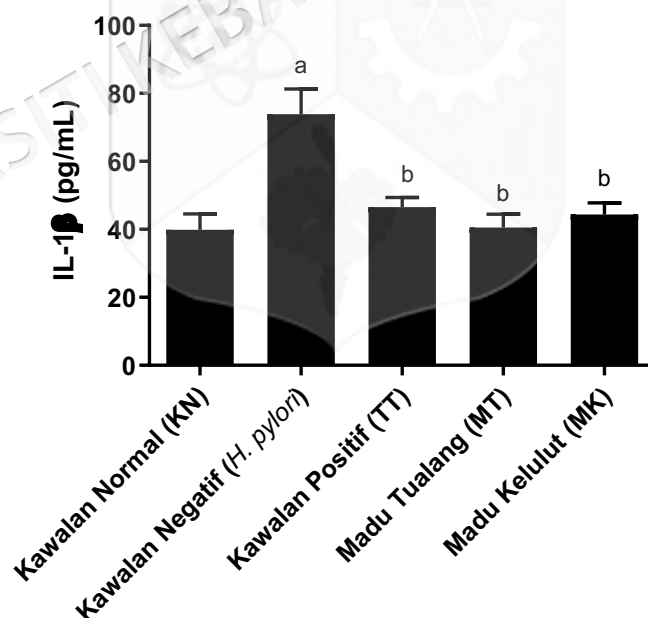
^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

^c Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan positif terapi tiga serangkai (TT)

4.9 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS INTERLEUKIN-1 β (IL-1 β) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.6 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras sitokin IL-1 β antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan aras sitokin IL-1 β yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 46% ($p=0.0003$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN). Kesemua kumpulan rawatan berjaya menurunkan aras sitokin IL-1 β dengan signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Rawatan MT dan MK selama 14 hari dapat mengurangkan aras sitokin IL-1 β kepada tikus aruhan lesi gaster dijangkiti *H. pylori*, dengan pengurangan masing-masing sebanyak 45% ($p=0.0003$) dan 40% ($p=0.0015$). Kumpulan rawatan terapi tiga serangkai (TT) juga menunjukkan penurunan yang ketara sebanyak 37% ($p=0.0034$) berbanding kumpulan *H. pylori*. Tiada perbezaan yang signifikan dilihat antara kumpulan rawatan MT (40.530 ± 3.909 pg/mL) dan MK (44.340 ± 3.447 pg/mL) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (46.550 ± 2.846 pg/mL).



Rajah 4.6

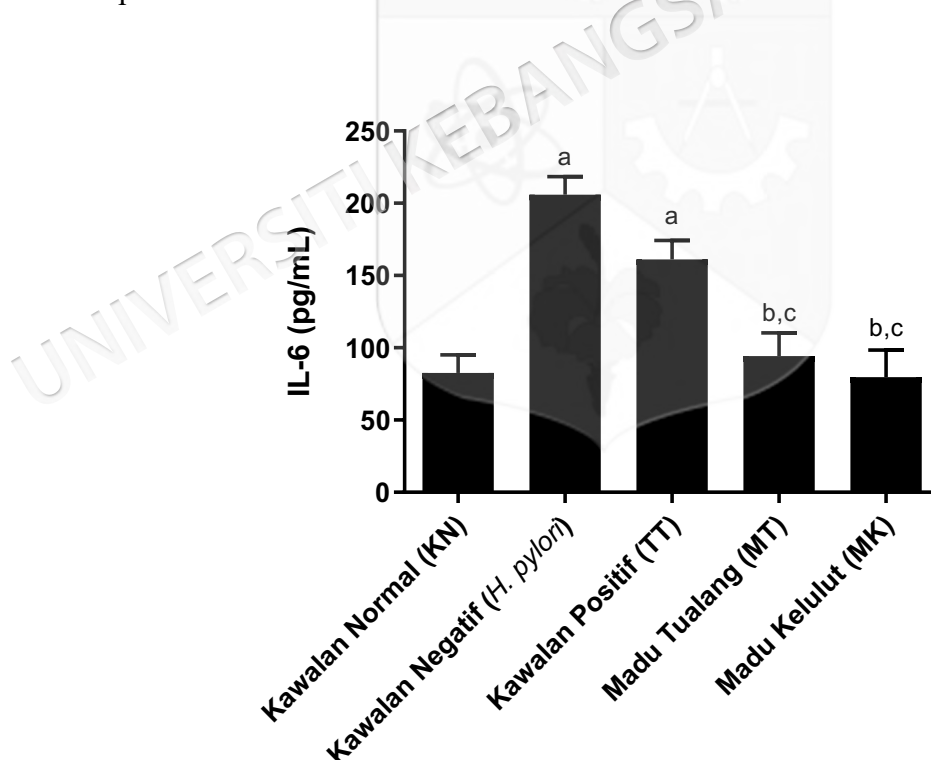
Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IL-1 β pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n = 6$)

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

4.10 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS INTERLEUKIN-6 (IL-6) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.7 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras sitokin IL-6 antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan aras sitokin IL-6 yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 60% ($p < 0.0001$) berbanding dengan kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MT dan MK dapat menurunkan aras sitokin IL-6 yang signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*), dengan penurunan masing-masing sebanyak 54% ($p = 0.0001$) dan 61% ($p < 0.0001$). Namun, tiada penurunan yang signifikan pada kumpulan rawatan terapi tiga serangkai (TT) (161.100 ± 13.120 pg/mL) berbanding kumpulan *H. pylori* (205.800 ± 12.490 pg/mL). Dapatan kajian antara kumpulan rawatan selama 14 hari menunjukkan MT dan MK berjaya menurunkan aras sitokin IL-6 kepada tikus aruhan lesi gaster dijangkiti *H. pylori*, dengan signifikan sebanyak 41% ($p = 0.0282$) dan 51% ($p = 0.0053$) berbanding kumpulan rawatan TT.



Rajah 4.7

Kesan madu Tualang (TH) dan madu Kelulut (KH) ke atas sitokin IL-6 pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n=6$)

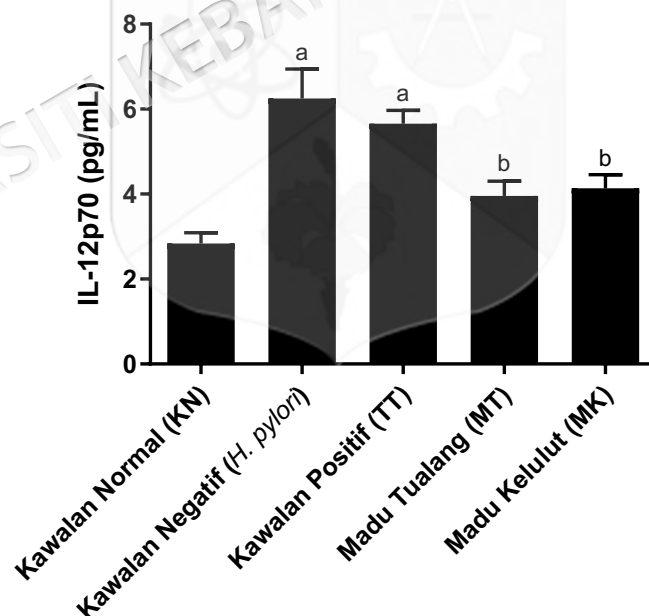
^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

^c Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan positif terapi tiga serangkai (TT)

4.11 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS INTERLEUKIN-12p70 (IL-12p70) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.9 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras sitokin IL-12p70 antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan aras sitokin IL-12p70 yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 55% ($p < 0.0001$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MT dan MK menunjukkan penurunan aras sitokin IL-12p70 yang signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*), dengan penurunan masing-masing sebanyak 37% ($p = 0.0054$) dan 34% ($p = 0.0114$). Tiada perubahan yang signifikan pada aras sitokin IL-12p70 pada kumpulan rawatan TT (5.656 ± 0.314 pg/mL) berbanding dengan kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) (6.249 ± 0.6918 pg/mL). Tiada perbezaan yang signifikan juga dilihat antara kumpulan rawatan MT (3.954 ± 0.353 pg/mL) dan MK (4.135 ± 0.325 pg/mL) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (5.656 ± 0.314 pg/mL).



Rajah 4.8

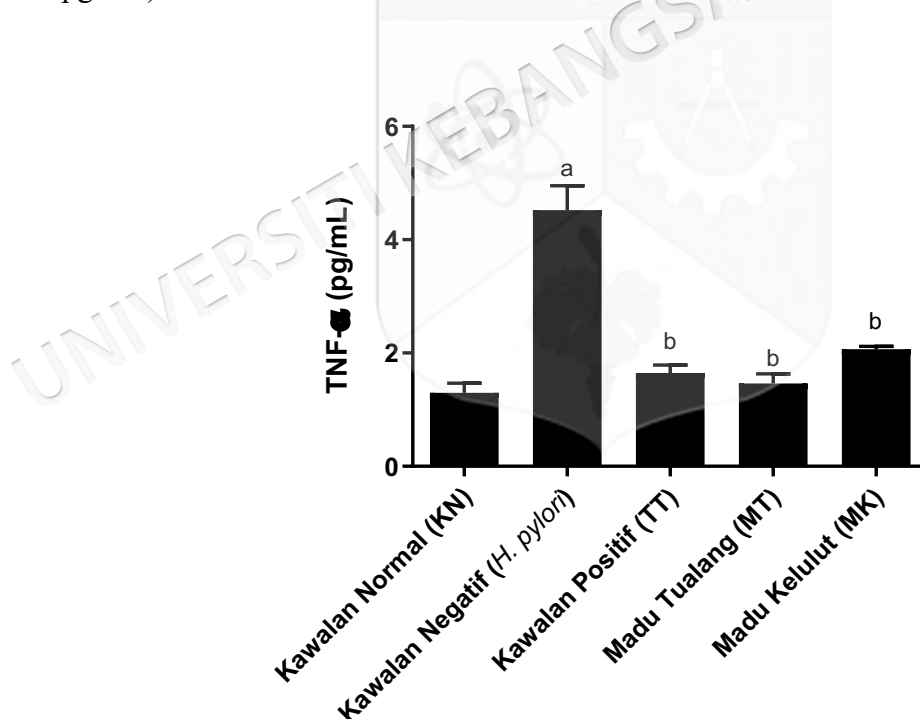
Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IL-12p70 pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n=6$)

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

4.12 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS FAKTOR NEKROSIS TUMOR- α (TNF- α) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.8 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras sitokin TNF- α antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (HP) menunjukkan peningkatan aras sitokin TNF- α yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 71% ($p < 0.0001$) berbanding dengan kumpulan kawalan normal (KN). Kesemua kumpulan rawatan berjaya menurunkan aras sitokin TNF- α dengan signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Rawatan MT dan MK selama 14 hari dapat mengurangkan aras sitokin TNF- α kepada tikus aruhan lesi gaster dijangkiti *H. pylori*, dengan pengurangan masing-masing sebanyak 68% ($p < 0.0001$) dan 54% ($p < 0.0001$). Kumpulan rawatan terapi tiga serangkai (TT) juga menunjukkan penurunan yang ketara sebanyak 64% ($p < 0.0001$) berbanding kumpulan *H. pylori*. Tiada perbezaan yang signifikan dilihat antara kumpulan rawatan MT (1.460 ± 0.172 pg/mL) dan MK (2.067 ± 0.051 pg/mL) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (1.645 ± 0.142 pg/mL).



Rajah 4.9

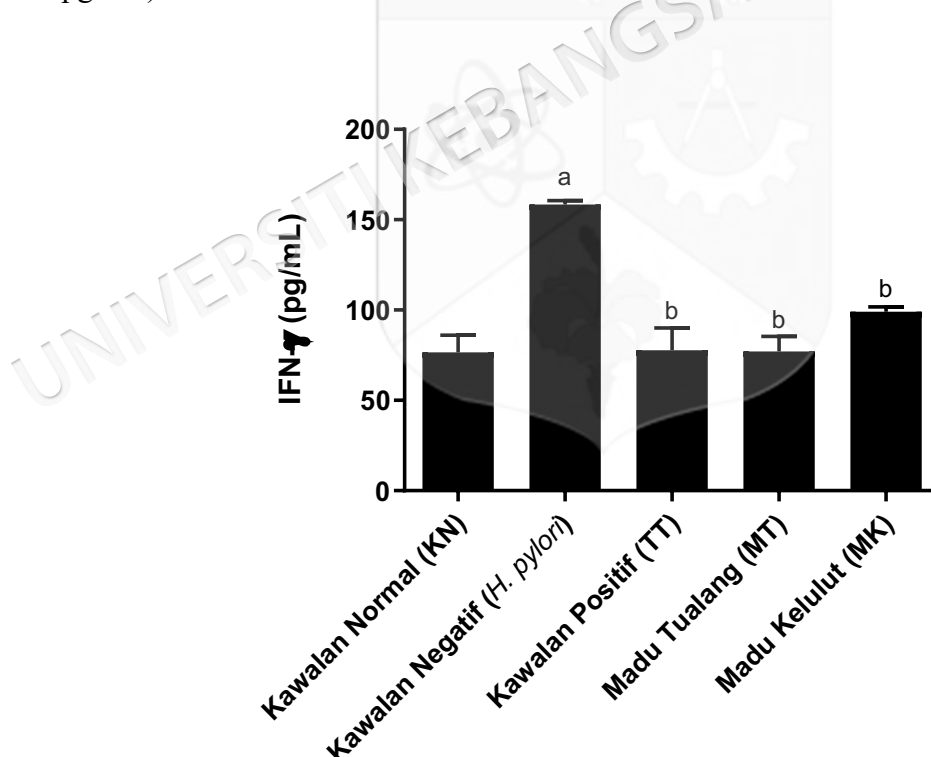
Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin TNF- α pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n=6$)

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

4.13 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS INTERFERON- γ (IFN- γ) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.11 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras sitokin IFN- γ antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (HP) menunjukkan peningkatan aras sitokin IFN- γ yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 52% ($p < 0.0001$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN). Kesemua kumpulan rawatan berjaya menurunkan aras sitokin IFN- γ dengan signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Rawatan MT dan MK selama 14 hari dapat mengurangkan aras sitokin IFN- γ kepada tikus aruhan lesi gaster dijangkiti *H. pylori*, dengan pengurangan masing-masing sebanyak 51% ($p < 0.0001$) dan 37% ($p = 0.0002$). Kumpulan rawatan terapi tiga serangkai (TT) juga menunjukkan penurunan yang signifikan sebanyak 51% ($p < 0.0001$) berbanding kumpulan *H. pylori*. Tiada perbezaan yang signifikan dilihat antara kumpulan rawatan MT (77.110 ± 8.372 pg/mL) dan MK (99.080 ± 2.636 pg/mL) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (77.790 ± 12.280 pg/mL)



Rajah 4.10

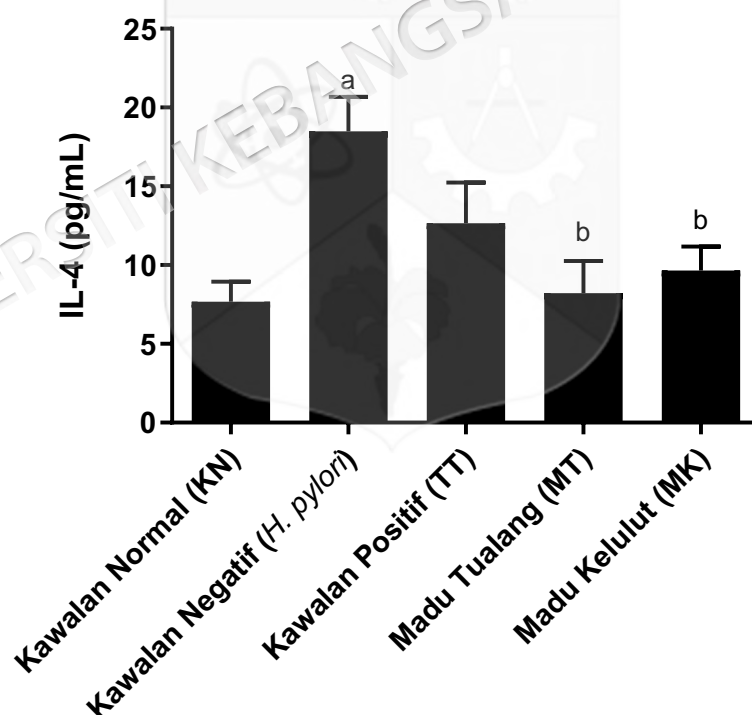
Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IFN- γ pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n=6$)

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

4.14 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS INTERLEUKIN-4 (IL-4) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.10 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras sitokin IL-4 antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan aras sitokin IL-4 yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 58% ($p=0.0056$) berbanding dengan kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MT dan MK menunjukkan penurunan aras sitokin IL-4 yang signifikan dengan pengurangan masing-masing sebanyak 55% ($p=0.0090$) dan 48% ($p=0.0302$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Tiada perubahan pada aras sitokin IL-4 pada kumpulan rawatan TT (12.660 ± 2.573 pg/mL) berbanding kumpulan *H. pylori* (18.490 ± 2.183 pg/mL). Tiada perbezaan yang signifikan dilihat antara kumpulan rawatan MT (8.229 ± 2.037 pg/mL) dan MK (9.665 ± 1.517 pg/mL) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (12.660 ± 2.573 pg/mL).



Rajah 4.11

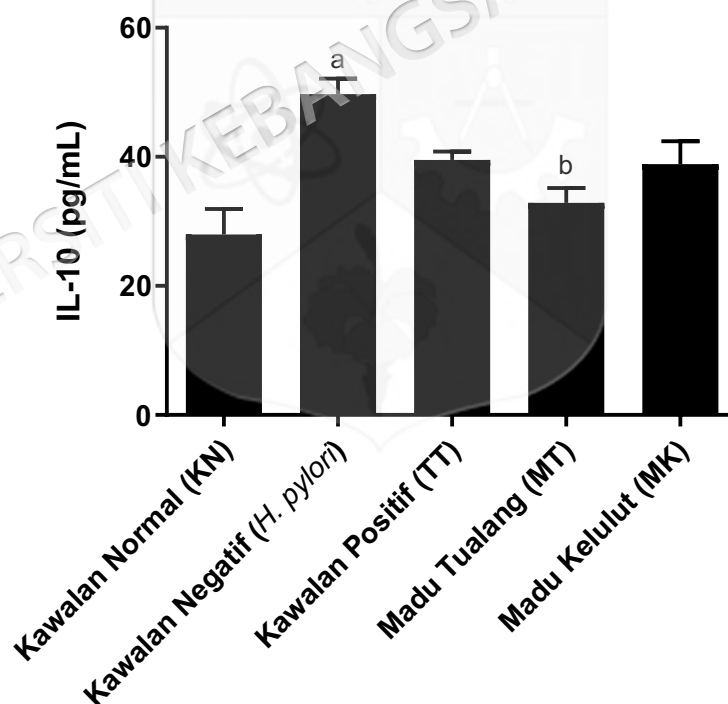
Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IL-4 pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n = 6$)

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

4.15 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS INTERLEUKIN-10 (IL-10) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.12 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras sitokin IL-10 antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan aras sitokin IL-10 yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 44% ($p=0.0001$) berbanding dengan kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MT menunjukkan penurunan aras sitokin IL-10 yang signifikan sebanyak 34% ($p=0.0028$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Tiada perubahan yang signifikan pada aras sitokin IL-10 pada kumpulan rawatan MK (38.890 ± 3.559 pg/mL) dan TT (39.540 ± 1.301 pg/mL) berbanding kawalan negatif (*H. pylori*) (49.740 ± 2.387 pg/mL). Tiada perbezaan yang signifikan juga dilihat antara kumpulan rawatan MT (32.880 ± 2.302 pg/mL) dan MK (38.890 ± 3.559 pg/mL) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (39.540 ± 1.301 pg/mL).



Rajah 4.12

Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin IL-10 pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n=6$)

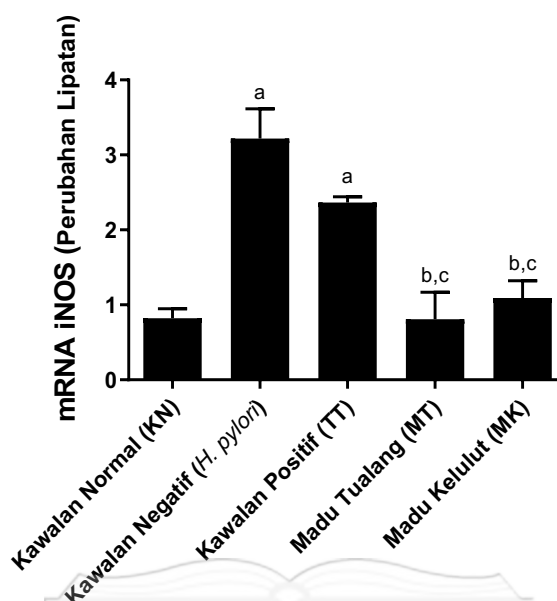
^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

4.16 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS PENGEKSPRESAN GEN NITRIK OKSIDA SINTASE TERARUH (INOS) DAN KANDUNGAN NITRIK OKSIDA DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.13 dan 4.14 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada kandunagn NO tisu gaster antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan yang lebih tinggi pada pengekspresan gen yang mengekod enzim iNOS pada tisu gaster dengan signifikan sebanyak 74% ($p < 0.0001$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MT dan MK selama 14 hari dapat mengurangkan pengekspresan iNOS pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*, dengan penurunan masing-masing sebanyak 75% ($p < 0.0001$) dan 66% ($p < 0.0001$). Namun, tiada penurunan yang signifikan pada kumpulan rawatan terapi tiga serangkai (TT) (2.365 ± 0.077 mRNA) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) (3.217 ± 0.398 mRNA). Dapatan kajian antara kumpulan rawatan selama 14 hari menunjukkan MT dan MK dapat mengurangkan pengekspresan iNOS dengan signifikan sebanyak 66% ($p = 0.0032$) dan 54% ($p = 0.0199$) berbanding kumpulan rawatan TT.

Manakala kandungan NO bagi kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 40% ($p = 0.0128$) berbanding dengan kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MT dan MK selama 14 hari dapat mengurangkan aras NO pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*, dengan penurunan masing-masing sebanyak 39% ($p = 0.0161$) dan 49% ($p = 0.0020$). Namun, tiada penurunan pada kumpulan rawatan terapi tiga serangkai (TT) (18.750 ± 1.351 nmol/g) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) (21.800 ± 1.044 nmol/g). Dapatan kajian antara kumpulan rawatan selama 14 hari menunjukkan MK dapat mengurangkan kandungan NO dengan signifikan sebanyak 41% ($p = 0.0376$) berbanding kumpulan rawatan TT.



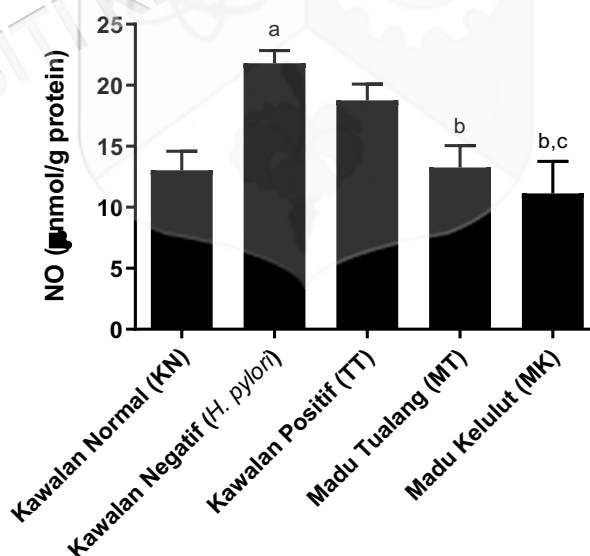
Rajah 4.13

Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas ekspresi mRNA nitrik oksida sintase teraruh (iNOS) pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai (n = 6)

^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

^c Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan positif (TT)



Rajah 4.14

Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas kandungan NO pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai (n = 6)

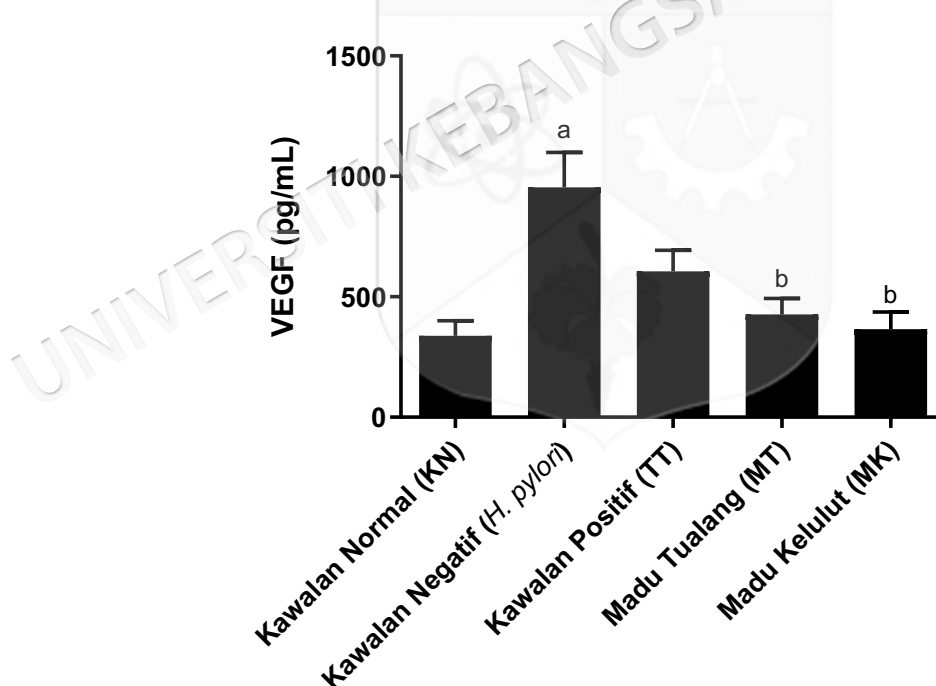
^a Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

^c Signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan positif (TT)

4.17 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS FAKTOR PERTUMBUHAN VASKULAR ENDOTELIAL (VEGF) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Rajah 4.15 menunjukkan perbezaan tisu gaster pada aras sitokin VEGF antara kumpulan kajian pada minggu akhir (minggu ke-8) kajian dijalankan. Kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan aras sitokin VEGF yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 65% ($p=0.0006$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN). Kumpulan rawatan MT dan MK menunjukkan penurunan aras sitokin VEGF yang signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*), dengan penurunan masing-masing sebanyak 55% ($p=0.0035$) dan 62% ($p=0.0011$). Tiada perubahan yang signifikan pada aras sitokin VEGF pada kumpulan rawatan TT (605.700 ± 87.730 pg/mL) berbanding dengan kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) (954.800 ± 145.100 pg/mL). Tiada perbezaan yang signifikan juga dilihat antara kumpulan rawatan MT (426.300 ± 66.880) dan MK (365.000 ± 71.960) dengan kumpulan kawalan positif (TT) (605.700 ± 87.730).



Rajah 4.15

Kesan madu Tualang (MT) dan madu Kelulut (MK) ke atas sitokin VEGF pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesemua data dinyatakan dalam purata $\pm$ ralat piawai ($n=6$)

^a Signifikan ($p<0.05$) berbanding kumpulan kawalan normal (KN)

^b Signifikan ($p<0.05$) berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*)

BAB V

PERBINCANGAN

5.1 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS AKTIVITI ANTI- *H. PYLORI* MELALUI UJIAN SUSEPTIBILITI ANTIMIKROB

Kebanyakan penyakit berjangkit adalah berpunca daripada jangkitan bakteria. Dengan penemuan kaedah makmal untuk pembiakan mikroorganisma menggunakan medium pertumbuhan sesuai yang dikenali sebagai "kultur," dan penentuan kerintangan patogen terhadap pelbagai agen antimikrob dapat memberi panduan kesihatan berkenaan regimen rawatan yang betul kepada pesakit (Lagier et al. 2015). Ujian suseptibiliti antimikrob (AST) adalah prosedur makmal yang dilakukan oleh ahli teknologi perubatan (makmal klinikal) untuk mengenal pasti regimen antimikrob khusus yang berkesan untuk pesakit. Pada skala yang lebih besar, ia membantu dalam penilaian perkhidmatan rawatan yang disediakan oleh hospital, klinik dan program kebangsaan untuk mengawal dan mencegah penyakit berjangkit. Penyelidik perlu melaksanakan aktiviti pengawasan secara berterusan mengenai corak kerintangan antibiotik dalam populasi bakteria (Graham et al. 1985; Sawatzky et al. 2015).

AST menentukan kepekatan antimikrob yang menghalang pertumbuhan mikrob, bagi kedua-dua agen jenis bakterisidal dan bakteriostatik (Brown et al. 2016; Sanguinetti dan Posteraro 2018; Humphries et al. 2019; Belkum et al. 2019). *H. pylori* adalah bakteria gram-negatif berbentuk spiral yang terdapat dalam perut manusia. Walau bagaimanapun, apabila berlaku ketidakseimbangan homeostasis dalam perumah, *H. pylori* akan berubah menjadi virulens yang boleh menyebabkan kecederaan dalam sistem pencernaan (Bonifácio et al. 2014; Dos Santos 2015; Hajimahmoodi et al. 2011;

Proctor and Deans 2014). Dalam tahun-tahun kebelakangan ini, terapi ke atas *H. pylori* telah menghadapi kesulitan disebabkan terapi pembasmian telah menjadi semakin kurang berkesan (Huang et al. 2015; Picoli et al. 2014). Rawatan utama terdiri daripada pemberian perencat pam proton (Omeprazole) bersama dua antibiotik (Amoxicillin dan Clarithromycin). Pilihan antibiotik biasanya bergantung kepada kawasan geografi dan kerintangan dadah yang menjejaskan rawatan (Bonifácio et al. 2014; Mégraud et al. 2014; Proctor and Deans 2014; Safavi 2016). Tambahan pula, kos rawatan antibiotik adalah mahal, bioavailabiliti yang tidak mencukupi, dan kesan sampingan yang boleh menyebabkan ketidakpatuhan pesakit kepada terapi (Sardi et al. 2013). Dalam dekad yang lalu, beberapa produk dari sumber semula jadi telah menunjukkan kesan yang menarik terhadap *H. pylori* (Bonifácio et al. 2014).

Dalam kajian ini, dapatan kajian menunjukkan madu Tualang dan madu Kelulut pada kepekatan yang berbeza (10, 20, 50, 75 (% v/v)) memberikan pelbagai aras aktiviti antibakteria terhadap *H. pylori* daripada segi saiz zon perencatan. Madu Tualang dan Kelulut pada kepekatan 75 % (v/v) menunjukkan zon perencatan tertinggi yang signifikan apabila dibandingkan dengan kepekatan lain. Kajian-kajian *in-vitro* terdahulu telah menunjukkan kesan madu dari sumber yang berbeza berjaya menghalang pertumbuhan *H. pylori* (Abdel-Latif & Abouzied 2016; Kim et al. 2017; 2015; Manyi-Loh et al. 2010; Ndip et al. 2007; Nzeako & Al-namaani 2006). Dapatan dalam kajian ini selari dengan kajian terdahulu oleh Manyi-Loh et al. (2010) yang melaporkan bahawa tiga madu tempatan (Goldcrest, Pure honey dan Citrus blossom) dari Afrika Selatan mempamerkan aktiviti antibakteria terhadap *H. pylori* pada kepekatan serendah 10% (v/v). Manakala dalam kajian lanjutan Manyi-Loh et al. (2013) melaporkan bahawa daripada enam jenis madu tempatan dari Afrika Selatan (Goldcrest, Pure honey, Citrus blossom, Champagne royal train, Honeyleine dan Heritage), madu Goldcrest, Pure honey dan Citrus blossom didapati paling aktif pada kepekatan 75% (v/v). Walaubagaimanapun, hasil dapatan kajian Manyi-Loh et al. direkodkan tidak signifikan apabila saiz zon perencatan madu-madu kajian dibandingkan dengan Clarithromycin (kawalan positif). Walaupun madu Tualang dan madu Kelulut menunjukkan aktiviti anti-*H. pylori*, namun terdapat ketidaksamaan dalam peratusan suseptibiliti *H. pylori* terhadap jenis madu yang diuji. Ketidaksamaan ini adalah berpunca daripada sumber bunga dan spesies tumbuhan yang diambil oleh lebah (AL-

Waili et al. 2013; Cheung et al. 2019; Yao et al. 2003). Komposisi, rasa dan warna madu yang berbeza bergantung kepada jenis sumber bunga, kawasan geografi, iklim, dan spesies lebah yang berbeza yang terlibat dalam pengeluaran madu (Puscas et al. 2013).

Terdapat pelbagai laporan mengenai aktiviti antibakteria pada komponen madu seperti pH, keosmolaran, dan aktiviti pemperoksidaan (Ghazali 2009; Mandal & Mandal 2011; Mohd-Aspar et al. 2019). Kehadiran bahan bukan peroksida seperti asid fenolik, flavonoid, dan lisozim juga menyumbang kepada aktiviti antimikrob madu (Chan et al. 2013; Sousa et al. 2016). Madu juga terdiri daripada asid organik seperti formik, asetik, butirik, oksalik, laktik, suksinik, folik, malik, sitrik, and glikolik yang menyumbang kepada ciri rasanya dan bertanggungjawab untuk kestabilan madu yang sangat baik terhadap mikroorganisma (Costa Ferreira da Cruz et al. 2019; Oertel 1980). Asid glukonik dianggap sebagai salah satu asid organik yang paling penting dalam madu dimana ia adalah produk pengoksidaan katalitik glukosa oksidase. Dalam pengoksidaan ini hidrogen peroksida (H_2O_2) juga terbentuk dan membentuk kesan antibakteria yang kuat (Nweze et al. 2019; White et al. 1963). Keasidan madu adalah disebabkan oleh kehadiran asid organik yang merupakan salah satu daripada komponen bukan peroksida, yang membentuk 0.57% komposisi madu. Komponen bukan peroksida akan menghalang kebanyakan mikroorganisma yang membesar pada pH antara 7.2 dan 7.4 (Kek et al. 2014). Kajian terdahulu oleh Kwakman et al. (2010) telah memeriksa sifat-sifat antimikrob yang terdapat pada madu secara *in-vitro* turut mendapati bahawa *Methylglyoxal* (MGO) dan peptida antimikrob (*bee defensin-1*) adalah mekanisme yang berbeza yang terlibat dalam aktiviti antibakteria madu. Sebatian MGO yang terdapat dalam madu Manuka mampu membunuh bakteria melalui potensi osmotik. Sifat antibakteria MGO juga menyebabkan perubahan dalam struktur fimbria dan flagelum bakteria yang akan mengehadkan motiliti dan pelekatan bakteria (Kwakman et al. 2010; Rabie et al. 2016). Gred madu dalam perubatan mempunyai potensi aktiviti bakterisidal secara *in-vitro* terhadap bakteria rintang antibiotik. Di samping itu, madu juga adalah higroskop, di mana ia boleh menarik kelembapan daripada kawasan persekitaran dan seterusnya membawa kepada dehidrasi pada bakteria (Yap et al. 2019).

Dalam kajian ini, Clarithromycin (0.05 mg/ml) yang digunakan sebagai rawatan piawai, menunjukkan zon perencatan yang jauh lebih besar berbanding kedua-dua madu Tualang dan madu Kelulut dengan signifikan. Regimen piawai untuk jangkitan *H. pylori* terdiri daripada ubat perencat pam proton dengan gabungan dua antimikrobial, Amoxicillin dan Clarithromycin atau Metronidazole. Rawatan ini menawarkan kadar keberkesanan dalam julat antara 70 dan 80 %, yang menjadikan perlunya untuk mencari alternatif terapeutik lain. Kegagalan terapi ini disebabkan terutamanya oleh jangkitan *H. pylori* yang rintang antibiotik (Gisbert & Calvet 2011; Savoldi et al. 2018).

5.2 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS STRUKTUR HISTOLOGI LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Histologi adalah kaedah yang sangat baik untuk mengesan *H. pylori* dan menyediakan maklumat tambahan mengenai struktur mikroskopik mukosa gaster. Teknik pewarnaan hematoksilin dan eosin (H&E) berfungsi untuk mengenali pelbagai jenis tisu dan perubahan morfologi terutamanya dalam diagnosis kanser. Hematoksilin berwarna biru-ungu yang mendalam dan mewarnai asid nukleik. Manakala eosin adalah berwarna merah jambu dan mewarnai protein. Dalam tisu normal, nukleus berwarna biru, manakala matriks sitoplasma dan ekstraselular mempunyai pelbagai warna merah jambu yang berperingkat. *H. pylori* merupakan bakteria berbentuk spiral, boleh dilihat dalam pewarnaan H&E, dengan sensitiviti dan spesifikasi pewarnaan H&E masing-masing dilaporkan sebanyak 69-93% dan 87-90%. Walau bagaimanapun, spesifikasi boleh dipertingkatkan kepada 90-100% dengan menggunakan pewarnaan khas seperti pewarnaan Giemsa yang diubahsuai (Fan et al. 2019; Lee & Kim 2015). Pewarnaan H&E secara langsung boleh mengenal pasti *H. pylori* pada pembesaran yang tinggi (x1000) dan menilai aras keradangan. Walau bagaimanapun, apabila ketumpatan *H. pylori* rendah dan perubahan mukosa atrofik digabungkan, ia menjadi sukar untuk melihat bakteria tersebut. Sebaliknya, pewarnaan Giemsa mudah digunakan, murah dan memberikan hasil yang konsisten yang menyebabkan kaedah pewarnaan Giemsa menjadi pilihan kebanyakan makmal (Boldt et al. 2015; Cha 2007). Lebih daripada 90 % biopsi gaster yang dijangkiti *H. pylori* menunjukkan gaster aktif kronik yang dicirikan dengan sekurang-kurangnya penyusupan limfoplasmasitik dan neutrofil yang sederhana. Kehadiran agregat limfoid, terutamanya dalam tisu gaster yang mempunyai pusat germinal merupakan petunjuk kepada kehadiran *H. pylori*. Jangkitan pada mukosa

fundus menghasilkan jalur sel mononuklear yang padat dengan keradangan di bawah permukaan epitelium (Cha 2007; Smith et al. 2012).

Dalam kajian ini, kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan kerosakan mukosa gaster tikus yang meluas kepada permukaan epitelium dan peningkatan purata skor yang signifikan berbanding kumpulan kawalan normal. Walau bagaimanapun, rawatan dengan MT atau MK selama 14 hari menunjukkan perbaikan terhadap histologi permukaan epitelium yang lebih baik pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*, setanding dengan rawatan kumpulan positif terapi tiga serangkai. Dapatan kajian ini juga menunjukkan bahawa rawatan dengan madu Tualang dan madu Kelulut adalah selamat pada haiwan yang digunakan dan menunjukkan kematian sifar. Madu memperbaiki kesan kecederaan oksidatif dan keradangan dalam mukosa gaster aruhan *H. pylori* dan memudahkan kesembuhan lesi gaster. Kesan sedemikian mungkin disebabkan oleh unsur-unsur yang terdapat pada madu dengan aktiviti biologi termasuk polifenol seperti flavonoid, asid fenolik dan vitamin larut air (vitamin B1, B2, B3, B9, dan B12 dan vitamin C) (Ciulu et al. 2011; Mannina et al. 2015; Pyrzynska & Biesaga 2009). Kajian terdahulu oleh Almasaudi et al. pada tahun 2016 telah menunjukkan bahawa madu Manuka menyediakan kesan gastroprotektif yang signifikan dalam model haiwan ulser gaster akut. Manakala kajian beliau pada 2017, menunjukkan madu Manuka (2.5 mg/kg) mempunyai potensi penyembuhan setanding dengan Ranitidine, yang merupakan ubat yang diluluskan oleh FDA dan digunakan secara klinikal untuk rawatan ulser. Kesimpulan sedemikian adalah berdasarkan data makroskopik, histopatologi, dan aliran *cytometric* (Almasaudi et al. 2017). Penemuan kajian klinikal terdahulu juga turut melaporkan mengenai penggunaan madu Manuka untuk penyembuhan luka kronik (Biglari et al. 2012; Dunford & Hanano 2004; Smith et al. 2009). Di mana pada kajian pemerhatian oleh Biglari et al. (2012) menunjukkan bahawa madu Manuka mempunyai kesan antiulser yang positif ke atas 20 pesakit yang mengalami kecederaan saraf tunjang dan yang mengalami ulser tekanan (stres) kronik (15 pesakit dengan ulser GRED III dan 5 pesakit dengan ulser gred IV). Tindakan sedemikian mungkin disebabkan oleh sebatian fenolik yang merupakan salah satu unsur utama madu Manuka (Tsang et al. 2015). Sebatian fenolik merangsang pengeluaran prostaglandin E₂ (PGE₂) yang menghasilkan mukus dan seterusnya menyediakan

perlindungan kepada saluran gastrousus daripada kecederaan (Alanko et al. 1999; Kassim, Achoui, Mansor, et al. 2010).

Komponen perencat pam proton (PPI) yang terdapat pada regimen terapi tiga serangkai untuk pembasmian *H. pylori* mempunyai pengaruh utama terhadap kejayaan terapi secara keseluruhan. Ini kerana PPI mempunyai kesan antibakteria yang intrinsik, dan yang lebih penting adalah bermungkinan untuk menukarkan yang bukan proliferasi (*nonproliferating*) iaitu bentuk bakteria yang dormant, menjadi bentuk berproliferasi dengan menaikkan pH, seterusnya meningkatkan kesan antibiotik dengan lebih tinggi (Marcus et al. 2012).

5.3 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS KEPEKATAN ASID GASTER DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Fisiologi perut bergantung pada kadar rembesan jus gaster, integriti mukosa gaster serta muskulturnya, di mana semuanya secara kolektif bertindak sebagai penghalang terhadap serangan agen-agen seperti NSAID, agen sitotoksik dan jangkitan *H. pylori*. Ulser gaster akan berlaku apabila faktor penyebab melebihi faktor pertahanan (Lebda et al. 2018). Walau bagaimanapun, terdapat beberapa kelenjar perembes dalam perut yang akhirnya merembeskan ke dalam sumur gaster. Salah satu daripadanya adalah kelenjar oksintik yang kebanyakannya terdiri daripada sel rembesan dipanggil sel parietal yang merembeskan jus asid gaster (Engevik et al. 2020; Forte & Zhu 2009; Holzer 2007). Jenis sel rembesan lain yang terdapat dalam perut adalah sel leher lendir mukus yang merembeskan mukus dan sel peptik yang merembeskan pepsinogen serta sel 'G' yang merembeskan gastrin (Eicher et al. 2018; Kim & Shivdasani 2016).

Walaupun asid gaster mempunyai peranan fisiologi yang penting pada manusia, rembesan yang berlebihan akan menyebabkan ulser peptik kerana ini akan mengalahkan mekanisme perlindungan mukosa gaster (Holzer 2007; Roy 2016; Watanabe et al. 2001). Rembesan asid gaster oleh sel parietal dipacu melalui proses bersandarkan tenaga yang memerlukan *hidrogen potassium adenosine triphosphatase* (H^+K^+ -ATPase) (Forte & Zhu 2009; Smolka & Backert 2012). Asetilkolina, gastrin dan histamina adalah perangsang yang terkenal dalam rembesan asid gaster yang pada akhirnya memainkan peranan fisiologi dalam mengawalatur rembesan asid gaster

(Beales 2002; Engevik et al. 2020). Pengaturan ini sama ada dikawal oleh mekanisme maklum balas negatif melalui rangsangan yang berasal dari otak atau setempat oleh refleks entero-gaster (*entero-gastric*) (Schubert & Peura 2008). Dengan ini, asid gaster merembeskan pepsinogen yang aktif yang juga memainkan peranan dalam sistem imun semula jadi dengan memusnahkan bakteria dan mikrob lain yang terdapat dalam perut (Ding & Zheng 2012; Elseweidy et al. 2010).

Jangkitan *H. pylori* pada pesakit mengakibatkan peningkatan secara signifikan pada output asid dan menyebabkan ulser duodenum, ini menunjukkan peranan utama asid dalam patogenesis pengulseran mukosa gaster. Bacaan pH yang berasid (pH rendah) pada permukaan gaster merangsang *H. pylori* mengaruh NF- κ B ikatan nuklear (Lillehoj et al. 2012; O'Toole et al. 2005). Peningkatan rembesan asid oleh *H. pylori* menyumbang kepada kerosakan mukosa gaster. Di peringkat kelenjar, *H. pylori* boleh merangsang keluaran histamin daripada sel-sel enterokromafin tikus yang menyumbang kepada peningkatan dalam rembesan asid (Kidd et al. 1997; Schubert 2014). Dalam kajian ini, aruhan *H. pylori* dengan kepekatan 10^8 CFU/ml setiap tikus sebanyak 2 kali sehari selama 7 hari menunjukkan peningkatan aras kepekatan asid gaster yang lebih tinggi dengan signifikan sebanyak 74% berbanding dengan kumpulan kawalan normal. Kajian terdahulu oleh Ramakrishna et al. (2015) turut melaporkan aruhan *H. pylori* lipopolisakarida (HP-LPS) dengan kepekatan 50 μ g setiap tikus selama empat hari menyebabkan peningkatan rembesan asid sebanyak 56%, mengesahkan peranan dalam pengulseran mukosa walaupun kajian Ramakrishna et al. menggunakan kaedah aruhan *H. pylori* yang berbeza dari kajian ini. Pengeluaran asid gaster yang tinggi pada pesakit dengan signifikan menyebabkan gastritis pada bahagian antrum umumnya dan berisiko tinggi untuk pembentukan ulser duodenum. Rembesan asid gaster yang rendah, sebaliknya, menyebabkan atrofi gaster yang kronik dan seterusnya menyebabkan karsinoma (Gschwantler & Dragosics 2000; Mégraud et al. 2015). Dalam kajian ini, rawatan madu Tualang dan madu Kelulut mampu mengurangkan kepekatan asid gaster ke atas tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*, dengan penurunan masing-masing sebanyak 60% dan 70%.

Kajian lalu telah membuktikan bahawa penggunaan madu boleh memberi manfaat kepada ulser peptik kerana kandungan antioksidannya. Manfaat kesihatannya

diterima secara meluas kerana ia mengandungi enzim, vitamin, mineral, flavonoid dan beberapa unsur-unsur lain (Alvarez-Suarez 2017; Samarghandian et al. 2017). Untuk mengelakkan ulser gaster, agen pelindung mukosa gaster mesti diperkukuhkan bagi mengelakkan ia daripada dimusnahkan oleh agen-agen penyebab (Amandeep et al. 2012; Reshetnyak & Reshetnyak 2017; Robinson et al. 2015). Oleh itu, salah satu modus dalam pencegahan dan rawatan ulser gaster adalah untuk mengurangkan kadar rembesan asid gaster atau meneutralkannya. Kajian Apugo & Obia (2020) menunjukkan bahawa mekanisme tindakan madu dalam mengurangkan keasidan gaster mungkin disebabkan oleh tindakan secara langsung pengurangan rembesan asid atau tindakan sebagai antasid untuk meneutralkan keasidan gaster atau kedua-duanya.

Kajian dalam kumpulan rawatan terapi tiga serangkai juga menunjukkan penurunan yang signifikan ke atas kepekatan asid gaster dalam tikus aruhan *H. pylori*. Omeprazole adalah perencat pam proton yang telah digunakan secara meluas sebagai agen perencat asid untuk rawatan gangguan asid gaster selama kira-kira 15 tahun (Aguilera-Castro et al. 2016; Li et al. 2004). Pendekatan klinikal untuk mengawal ulser gaster terdiri daripada agen yang bertindak dengan menghapus sisa spesies oksigen reaktif (ROS), menghalang pam hidrogen-kalium ($H^+-K^+-ATPase$), mencegah rembesan asid yang berlebihan dan pembasmian jangkitan *H. pylori*. Omeprazole yang merupakan salah satu dari terapi tiga serangkai, menghalang rembesan asid dengan bertindak pada penukar hidrogen-kalium ($H^+-K^+-ATPase$) pada membran plasma apikal mukosa gaster (Omar et al. 2017; Shin & Kim 2013). Dapatan dalam kajian ini menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan dilihat antara rawatan madu Tualang dan madu Kelulut berbanding dengan rawatan terapi tiga serangkai. Kajian terdahulu oleh Marcus et al. (2012) telah melaporkan kepentingan terapi PPI dalam rawatan antibiotik *H. pylori*. Marcus et al. mencadangkan bahawa PPI dikaitkan dengan penemuan asid nokturnal yang mungkin mengurangkan aras pH yang menyebabkan Ampicillin tidak berkesan dan bahawa pengurangan asid berpotensi meningkatkan keberkesanan klinikal terapi Amoxicillin. Ia seterusnya menunjukkan bahawa pengurangan asid yang berterusan harus menjadi matlamat untuk meningkatkan keberkesanan Ampicillin atau ubat-ubatan lain yang berkaitan dengan pertumbuhan bakteria. Namun ubat PPI yang terdapat dalam rawatan piawai terapi tiga serangkai mempunyai kesan samping yang boleh memudaratkan pesakit. Walaupun ia boleh berfungsi dengan berkesan untuk

mengurangkan kecederaan pada mukosa gaster pada pesakit yang dijangkiti *H. pylori*. Pengambilan Omeprazole yang berpanjangan boleh menyebabkan penurunan yang teruk pada bikarbonat plasma (atau asidosis metabolik) yang mempunyai kesan sampingan (Okamoto et al. 2012). Asid gaster terlibat dalam imuniti semulajadi, membantu dalam penghadaman (dengan pengaktifan pepsinogen) serta meningkatkan penyerapan mikronutrien dan vitamin tertentu termasuk besi, kalsium, dan vitamin B12 (Martinsen et al. 2005; Smith 2003; Trowers et al. 2014; Ulleberg et al. 2011). Oleh itu, penggunaan Omeprazole yang berpanjangan mungkin mengurangkan asid gaster secara berterusan ke aras yang boleh menjejaskan proses yang disebutkan di atas yang membawa kepada ketakcernaan protein tertentu, peningkatan kecenderungan kepada jangkitan dalam saluran gastrousus, kekurangan mikronutrien, osteoporosis dan lain-lain akibatnya (Eusebi et al. 2017; Kinoshita et al. 2018; Urbas et al. 2016). Oleh itu, pengambilan madu boleh menjadi sebagai alternatif tambahan dalam rawatan ulser peptik aruhan *H. pylori*.

5.4 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS MALONDIALDEHID (MDA) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Spesies oksigen reaktif (ROS) yang didefinisikan sebagai tekanan oksidatif, adalah produk kepada pelbagai reaksi biokimia. Pengeluaran berlebihan ROS dalam keradangan kronik atau penyakit kronik mempunyai kesan toksik pada sel normal dan meningkatkan risiko kematian sel, mutasi, 'aberrations' kromosom, dan pembentukan kanser (Cerutti 1985; Mittal et al. 2014; Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016). Malondialdehid (MDA) sebagai penanda pemperoksidaan lipid, mempunyai potensi untuk merosakkan biomolekul seperti protein, DNA atau RNA selular, dan menyebabkan kanser akibat kerosakan selular oksidatif (Barrera et al. 2018; Gentile et al. 2017; Kwiecien et al. 2014). Aras MDA akan lebih tinggi pada mukosa gaster yang dijangkiti *H. pylori* berbanding dengan tisu normal, dan penurunan aras MDA dengan signifikan dilihat selepas pembasmian *H. pylori* (Al Batran et al. 2013; Saremi et al. 2020; Tartibian & Maleki 2012).

Tambahan pula, aras MDA meningkat dengan signifikan dalam tisu kanser gaster dan serum pesakit yang menghadapi kanser gaster (Khanzode et al. 2003; Ma et al. 2013) Penemuan ini menunjukkan bahawa ROS memainkan peranan patologi dalam

pathogenesis jangkitan *H. pylori*. ROS dihasilkan oleh neutrofil, sel endotelium vaskular, sel mukosa gaster, dan *H. pylori* itu sendiri. Tekanan oksidatif yang disebabkan oleh jangkitan *H. pylori* mungkin menjejaskan transdusi signal sel epitelium gaster dan menyebabkan kerosakan DNA (Alzahrani et al. 2014; Jung et al. 2001; Obst et al. 2000). MDA yang merupakan produk peroksida lipid terbentuk semasa penguraian hidroperoksida lipid dan menghasilkan produk mutagenik peroksida lipid, yang mungkin terlibat dalam karsinogenesis (Ma et al. 2013; Marnett 1999).

Dalam kajian ini, kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan pada kandungan MDA yang lebih tinggi dengan signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan normal. Hasil ini mencadangkan bahawa pembentukan lesi pada mukosa gaster mungkin disebabkan oleh radikal bebas yang menjadi perantaraan bagi peroksidasi lipid. Hasil kajian ini menyokong hasil kajian lepas yang menunjukkan bahawa proses peroksidasi lipid merupakan mekanisme asas untuk kecederaan tisu pada sistem gastrousus (Ma et al. 2013; Ramakrishna et al. 2015). Di bawah keadaan keradangan, ROS dihasilkan daripada pelbagai sumber dan mampu menyebabkan kerosakan kepada pelbagai unsur selular, seperti asid nukleik, protein, dan lipid (Ohnishi et al. 2013). *H. pylori* mengaruh lesi gaster boleh digambarkan sebagai akumulasi kerosakan DNA oksidatif yang berterusan dengan berpotensi sebagai mutagenik dan karsinogenik. Di samping itu, pembasmian *H. pylori* akan menyebabkan penurunan yang signifikan terhadap ROS (Kim et al. 2012).

Hasil kajian ini menunjukkan dengan rawatan madu Tualang dan madu Kelulut, mampu menurunkan aras MDA yang signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Penurunan aras MDA yang lebih rendah dalam kumpulan madu yang dirawat jelas menandakan peranan perlindungan madu sebagai antioksidan terhadap tekanan oksidatif pada lesi gaster yang disebabkan oleh jangkitan *H. pylori*. Dalam satu kajian menggunakan madu manuka, Almasaudi et al. (2017) melaporkan bahawa madu dapat menghalang ulser gaster yang disebabkan oleh etanol dengan memelihara kedua-dua enzim dan bukan enzim antioksidan dan seterusnya dapat menghalang pemperoksidaan lipid. Madu mempunyai kesan yang berpotensi dalam keadaan tekanan oksidatif yang tinggi, dan keupayaannya untuk memodulasi enzim antioksidan serta sifat antioksidatifnya memberikan kesan perlindungan terhadap tekanan oksidatif

(Mohamed et al. 2011; Moskaug et al. 2005). Kajian terkini telah menunjukkan hubungan yang kuat antara kandungan sebatian fenolik yang terdapat dalam madu dari pelbagai sumber bunga dan kapasiti antioksidan serta kesan manfaatnya terhadap kesihatan manusia (Estevinho et al. 2008; Morais et al. 2011; Schramm et al. 2003; Tartibian & Maleki 2012). Salah satu manfaat sebatian fenolik adalah ia akan menstabilkan membran sel dengan mengurangkan peroksidan lipid dan menghapus sisa radikal bebas, dan pada masa yang sama meningkatkan integriti membran terhadap beberapa keadaan tekanan kimia dan fizikal (Chaudhuri et al. 2007; Ferreira et al. 2009). Madu juga dilaporkan menunjukkan aktiviti rencatan yang kuat terhadap radikal bebas dengan pencegahan kerosakan sel yang signifikan, perencatan sepenuhnya terhadap pengoksidaan membran sel, pengeluaran ROS intraselular, dan pemulihan glutathione (*glutathione*) intraselular dalam sel endothelium. Kesan perlindungan ini dikaitkan dengan kehadiran asid fenolik dan flavonoid. Sebatian fenolik yang terdapat dalam madu dapat menghapus sisa radikal bebas dan menghalang pengeluaran MDA, biopenda kerosakan oksidatif secara bersandarkan kepekatan (*concentration-dependent manner*) (Beretta et al. 2007; Boussaid et al. 2014; Kassim, Achoui, Mustafa, et al. 2010).

Dalam usaha mencari keberkesanan ubat regimen terapi tiga serangkai, perencat pam proton telah dikaji secara komprehensif dengan dua antibiotik lain. Omeprazole adalah yang paling banyak dikaji dengan gabungan sama ada Metronidazole dan Amoxicillin atau Metronidazole dan Clarithromycin. Kedua-dua regimen mempunyai kadar pembasmian melebihi 85 % (O'Connor et al. 2016; Papastergiou 2014). Kajian ini juga mendapati bahawa rawatan terapi tiga serangkai juga berkesan menghalang peningkatan kandungan MDA tisu gaster berbanding dengan kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Kandungan MDA dalam rawatan terapi tiga serangkai juga tidak berbeza secara signifikan jika dibandingkan dengan rawatan madu Tualang dan madu Kelulut. Ini merupakan asas yang baik untuk membandingkan kesan madu Tualang dan madu Kelulut dengan terapi tiga serangkai kerana ia merupakan salah satu ubat piawai yang diberikan untuk rawatan penyakit ulser peptik aruhan *H. pylori* yang juga mempunyai kesan antioksidan. Walaupun lebih dikenali untuk aktiviti pengurangan asid gaster, Omeprazole juga mempunyai fungsi antioksidan. Omeprazole juga telah dilaporkan mampu menghalang penghasilan radikal hidroksil, peroksidasi lipid dan

pengoksidaan protein (Abed et al. 2020; Biswas et al. 2003). Dapatan ini mencadangkan bahawa kesan terapi tiga serangkai bukan sahaja terhad pada kebolehan agen ini mengurangkan rembesan asid gaster tetapi ia juga memiliki kesan antioksidan yang baik. Dapatan kajian ini juga mencadangkan bahawa, potensi dan efikasi kedua-dua sediaan ini tidak berbeza dalam mengurangkan proses peroksidasi lipid yang meningkat akibat aruhan *H. pylori*.

5.5 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS ENZIM KATALASE (CAT), SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) DAN GLUTATION PEROKSIDASE (GPX) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Tekanan oksidatif dan gangguan perut adalah proses patofisiologi yang berkait rapat (Suzuki et al. 2012). Pengeluaran spesies oksigen reaktif (ROS) yang berlebihan di bawah tekanan oksidatif mengakibatkan kerosakan selular. Untuk mengekalkan homeostasis gastrousus dengan menghapus sisa ROS, sel-sel gaster mempunyai beberapa enzim antioksidan endogenus seperti superoksida dismutase (SOD), glutation peroksidase (GPx), dan katalase (CAT). Antioksidan adalah molekul yang menghalang atau menghilangkan reaksi radikal bebas dan melewati atau menghalang kerosakan selular dalam perut (Birben et al. 2012; Tandon et al. 2004). SOD pemangkin dismutasi O_2 kepada H_2O_2 (Bhattacharyya et al. 2014). Aktiviti SOD yang berkurangan menyebabkan ulser gaster, manakala peningkatan aktiviti SOD telah dikaitkan dengan penyembuhan ulser pada pesakit (Fridovich 2013; Naito et al. 1992). H_2O_2 yang dibentuk dipecahkan lagi oleh enzim antioksidan, GPx atau CAT (Kwiecien et al. 2014). GPx mengurangkan H_2O_2 dan menghalang peroksidasi lipid secara langsung atau tidak langsung oleh pengantaraan peroksida lipid. CAT mempercepatkan pecahan H_2O_2 kepada air dan oksigen. Oleh itu, sistem pertahanan antioksidan mempunyai peranan penting dalam melindungi integriti mukosa gaster.

Kajian kami menunjukkan bahawa lesi gaster aruhan *H. pylori* mendorong kepada tekanan oksidatif dalam mukosa gaster dan penyusutan aktiviti enzim antioksidan, seperti SOD, CAT, dan GPx. Jangkitan bakteria *H. pylori* akan menyebabkan penyusutan fagosit ke dalam lapisan gaster sub-epitelium, terutamanya neutrofil dan makrofaj, yang menghasilkan sejumlah besar ROS dalam tindakbalas pertahanan perumah (Blaser 1990; Cherdantseva et al. 2014; Odenbreit et al. 2001).

Terdapat bukti menunjukkan bahawa *H. pylori* membawa kepada peningkatan pengeluaran O_2^- melalui NADPH oxidase dalam sel gaster yang dirangsang oleh lipopolisakarida dan xantine oksidase, iaitu mekanisme lain bagi penjanaan oksigen-pemeroleh radikal bebas (Ben-Hamida et al. 1998; Gobert & Wilson 2017). Radikal oksigen yang dihasilkan dalam gaster sel epitelium jangkitan *H. pylori* boleh menggagalkan mekanisme pertahanan antioksidan dan mengaktifkan ekspresi gen keradangan, lekatan molekul dan bahan pengantara yang merangsang proliferasi sel serta sebagai pertahanan molekul *chaperones* dalam sel epitelium gaster (Alzahrani et al. 2014b; Ding et al. 2007). Radikal bebas ini juga dipercayai sebagai pelaku yang menyumbang kepada proses penuaan dengan menyebabkan kerosakan selular dan molekul, seperti kerosakan DNA, mitokondria meruntuh dan pengoksidaan protein, lipid dan karbohidrat (Kim et al. 2012). Oleh itu, fungsi antioksidan adalah untuk memerangi radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh dengan meneutralkannya dan melindungi sel-sel daripada kerosakan.

Walau bagaimanapun, rawatan madu Tualang dan madu Kelulut dalam kajian ini dapat memperbaiki sistem pertahanan antioksidan SOD, CAT, dan GPx dalam perut tikus lesi gaster dengan signifikan. Dapatan kajian ini boleh dijelaskan dengan sebahagian keupayaan madu Tualang dan madu Kelulut untuk mengurangkan aras MDA. Namun, perubahan ini tidak diperhatikan pada kumpulan rawatan terapi tiga serangkai dalam meningkatkan aktiviti antioksidan. Kajian oleh Almasaudi et al. (2017) melaporkan bahawa pemberian madu Manuka mengganggu proses oksidatif melalui pengurangan aras radikal bebas (MDA) dan meningkatkan aras GSH, GPx, SOD, dan CAT. Kajian tersebut menunjukkan bahawa madu Manuka meningkatkan aktiviti GPx untuk membentuk GSH dan meningkatkan penyingkiran metabolit reaktif bersama dengan GSH. Kajian terdahulu oleh Henriques et al. (2006) juga turut melaporkan bahawa madu Manuka mempunyai aktiviti antioksidan yang paling berkesan di antara semua jenis madu yang mereka uji, dimana ia dapat menghilangkan radikal hidroksil bebas dengan cepat. Perlu diperhatikan bahawa punca botanikal madu mempunyai pengaruh aktiviti anti-oksida terbesar, semasa pemprosesan, pengendalian dan penyimpanan hanya sedikit menjejaskan kapasiti anti-oksida (Arráez-Román et al. 2006; Beretta et al. 2005; Castro-Vázquez et al. 2009; Küçük et al. 2007; Sereia et al. 2011). Aktiviti anti-oksida telah terbukti sangat berkait dengan kandungan jumlah

fenolik (Blasa et al. 2006; Lachman et al. 2007; Rashed & Soltan 2004). Di samping itu, korelasi yang kuat telah ditemui antara aktiviti antioksidan dan warna madu. Ramai penyelidik telah melaporkan bahawa warna madu yang lebih gelap mempunyai jumlah kandungan fenolik yang lebih tinggi yang menyebabkan kapasiti antioksidan yang lebih tinggi (Bertoncelj et al. 2007; Kek et al. 2014; Khalil et al. 2011; Tewari & Irudayaraj 2004). Kehadiran radikal bebas dan ROS amat penting dalam proses disfungsi selular, patogenesis penyakit metabolik dan kardiovaskular serta penuaan. Pengambilan makanan dan bahan yang kaya dengan antioksidan boleh melindungi daripada perubahan patologi ini dan seterusnya menghalang patogenesis gangguan keradangan kronik (Griffiths et al. 2016).

Penyelidik-penyelidik terdahulu juga telah melaporkan bahawa madu mengandungi beberapa bahan penting terutamanya anti-oksidan (Alvarez-Suarez et al. 2013; Beretta et al. 2005; Costa Ferreira da Cruz et al. 2019; Estevinho et al. 2008; Schramm et al. 2003). Madu semulajadi mengandungi banyak flavonoid (seperti apigenin, *pinocembrin*, kaempferol, kuersetin, *galangin*, krisin dan hesperetin), asid fenolik (seperti elagik, kafein, p-kumarit dan asid ferulik), asid askorbik, tokoferol, katalase, superoksida dismutase, glutathion terkurang (*reduced glutathione*), produk tindak balas Maillard dan peptida yang kebanyakannya bekerjasama untuk memberikan kesan sinergistik antioksidan dan aktiviti farmaseutikal (Al-Mamary et al. 2002; Habib et al. 2014; Hussein et al. 2011; Keng et al. 2017; Rababah et al. 2014). Kajian terdahulu oleh Busserolles et al. (2002) melaporkan di mana dua rawatan madu *Buckwheat* diberikan kepada 37 orang dewasa yang sihat pada kadar 1.5 g/kg berat badan, dengan sirap jagung sebagai kawalan kajian telah menunjukkan peningkatan yang signifikan pada kandungan jumlah-fenolik plasma dan plasma anti-oksidan. Kajian tersebut memberi tanggapan bahawa antioksidan fenolik daripada madu yang diproses adalah bioavailabiliti di mana ia dapat meningkatkan aktiviti antioksidan pada plasma. Oleh itu, kajian tersebut menyokong penggantian madu dalam beberapa makanan sebagai pemanis tradisional untuk meningkatkan sistem pertahanan anti-oksida pada orang dewasa yang sihat (Busserolles et al. 2002). Oleh itu, dapatan kajian ini menunjukkan bahawa potensi antioksidan madu Tualang dan madu Kelulut yang tinggi dapat meningkatkan aktiviti enzim antioksidan dalam perut sebagai pelindung.

Walaupun sering dianggap setara dengan hasil klinikal, potensi sifat farmakologi PPI agak berbeza. Kajian terdahulu melaporkan bahawa PPI yang berbeza pada pelbagai dos boleh memberikan kadar kesembuhan yang berbeza dan profil kesan sampingan yang berbeza (Freedberg et al. 2017). Dalam kajian ini, tiada perubahan yang signifikan pada antioksidan SOD, CAT, dan GPx dengan pemberian rawatan terapi tiga serangkai. Ini tidak selari dengan dapatan yang diperolehi dengan rawatan madu Tualang dan madu Kelulut. Walau bagaimanapun, rawatan terapi tiga serangkai mampu mengurangkan kandungan MDA aruhan *H. pylori* yang selari dengan penurunan keasidan gaster serta pengurangan lesi gaster. Omeprazole mempunyai keupayaan untuk mengundurkan pengoksidaan sebagai tambahan kepada kesannya sebagai perencat rembesan asid dan mampu mengurangkan peroksidasi lipid pada mukosa gaster (Abed et al. 2020; Biswas et al. 2003)

5.6 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS EKSPRESI GEN NITRIK OKSIDA SINTASE TERARUH (INOS) DAN KANDUNGAN NITRIK OKSIDA DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Nitrik oksida (NO) merupakan pengantara untuk pelbagai tindakan biologi di bawah keadaan fisiologi. NO meningkatkan aktiviti *guanylate cyclase* untuk meningkatkan kepekatan guanosin monofosfat siklik (cGMP), yang mempunyai pelbagai fungsi dalam tisu (Gyires et al. 2012; Kim 2005). Kajian sebelum ini telah menunjukkan bahawa NO adalah pengawal atur mikroedaran mukosa gaster di bawah keadaan normal dan dirangsang serta berinteraksi dengan *prostanoids* dan *neuropeptida* sensori untuk mengekalkan integriti mukosa gaster (Gyires et al. 2012; Whittle et al. 1990). Untuk tindakan perlindungan mukosa oleh NO, pengawalaturan aliran darah mukosa gaster adalah penting. Mekanisme pertahanan lain yang diaruh oleh NO adalah rangsangan rembesan mukus dalam sel epitelium, perencatan pengagregatan dan lekatan platelet dan perencatan pelekatan neutrofil kepada endotelium dan migrasi NO kepada saluran darah dan seterusnya menghapus sisa radikal superoksida yang menyebabkan kerosakan mukosa (Liang et al. 2021; Wallace & Miller 2000). Walau bagaimanapun, rembesan bikarbonat adalah salah satu faktor pertahanan dalam mukosa gastroduodenum, telah ditingkatkan oleh perencat NO sintase (*NO synthase inhibitors*), yang bercanggah dengan peranan pelindung mukosa NO. Sebaliknya, anion superoksida (O_2^-) dan NO dengan cepat bertindak balas untuk membentuk peroksinitrit,

yang akan terurai dan menjana molekul oksida yang kuat (Beckman et al. 1990; Gopalakrishnan et al. 2012).

Dalam kajian ini kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan yang lebih tinggi pada kandungan NO dan ekspresi mRNA iNOS pada tisu gaster dengan signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan normal. Aras NO meningkat dengan signifikan pada tikus aruhan *H. pylori* akibat rangsangan iNOS. NO radikal bebas yang dihasilkan oleh iNOS boleh bertindak sebagai pertahanan dan molekul pengawalan dengan aktiviti homeostatik. Walau bagaimanapun, ia juga boleh menjadi oksidan apabila ianya dihasilkan secara berlebihan (Angrisano et al. 2012; Perfetto et al. 2004; Xiong et al. 2000). Kajian-kajian terdahulu jelas menunjukkan penglibatan tekanan oksidatif dalam ekspresi iNOS dan apoptosis yang dirangsang oleh *H. pylori* dalam sel AGS epitelium gaster. Enzim iNOS aruhan *H. pylori* dikawal atur oleh radikal oksigen dan menghalang sel-sel yang ditranskripsikan dengan oligonukleotida *antisense* untuk NF- κ B subunit p50 (Cherdantseva et al. 2014; Lim et al. 2001). NO ini adalah satu molekul pro-keradangan penting yang dikeluarkan semasa tindakbalas keradangan akut dan kronik dan ia berkaitan dengan eksudasi dan kemotaksis selular (Koelzer et al. 2009). NO disintesis daripada L-arginin oleh NOS dan NOS2 atau iNOS (Huskić et al. 2006; Poon et al. 2003). Enzim iNOS mengawal atur tindakbalas kepada keradangan dan menjadi pengantara pro-keradangan, dan produknya boleh mempengaruhi banyak aspek latta (*cascade*) keradangan (Kassim et al. 2010).

Rawatan madu dalam kajian ini menunjukkan terdapat pengurangan yang ketara dalam kandungan NO dan ekspresi mRNA iNOS dalam kumpulan rawatan madu Tualang dan madu Kelulut. Namun, perubahan ini tidak diperhatikan dalam kumpulan rawatan terapi tiga serangkai. Penemuan ini boleh dikaitkan dengan keupayaan madu untuk menyebabkan kawal atur menurun ekspresi mRNA iNOS yang membawa kepada pengurangan pengeluaran NO gaster. Kajian Hussein et al. (2012) telah menunjukkan bahawa keradangan yang disebabkan oleh karagenan dalam tikus meningkatkan pengeluaran NO dalam plasma dan ekspresi iNOS dalam tisu tapak kaki tikus. Kajian tersebut menunjukkan bahawa madu Gelam pada dua kepekatan yang berbeza (1 dan 2 g/kg berat badan) dengan signifikan menurunkan aras NO dalam plasma, dan

pengurangan itu adalah akibat daripada perencatan iNOS, enzim utama yang bertanggungjawab untuk pengeluaran NO di bawah keadaan patologi, di mana madu atenuat translokasi NF- κ B kepada nukleus dan menyekat perencat kappa B (IkB α). Penemuan ini menunjukkan bahawa madu Gelam mungkin memberi tindak balas antiradang dengan menghalang enzim iNOS. Sebatian fenolik yang terdapat pada madu telah dilaporkan bermanfaat dalam rawatan penyakit keradangan kronik yang dikaitkan dengan penghasilan NO yang berlebihan dan mempunyai peranan utama dalam perencatan PGE₂ dalam tisu yang mengalami keradangan (Borsato et al. 2014; Hussein et al. 2012, 2013). Kajian terdahulu juga telah menunjukkan bahawa madu mempunyai sebatian fenolik yang tinggi dan aktiviti menghapus sisa radikal (Chua & Ismail 2015; Kishore et al. 2011; Leong et al. 2012) dan kajian ini berkemungkinan besar menunjukkan bahawa sebatian fenolik yang terdapat dalam madu Tualang dan madu Kelulut boleh menyumbang kepada aktiviti antiradang.

5.7 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS KANDUNGAN PROTEIN SITOKIN DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Keradangan adalah tindakbalas biologi badan yang kompleks mengenai kerosakan sel dan tisu vaskular, yang boleh diklasifikasikan sebagai sama ada akut atau kronik bergantung kepada jangka masa (Ferrero-Miliani et al. 2007; Lordan et al. 2019). Keradangan akut adalah tindakbalas utama badan terhadap rangsangan yang cedera yang dicirikan oleh kesakitan, haba, kemerahan, bengkak, dan kehilangan fungsi (Gyurkovska et al. 2011; Kotas & Medzhitov 2015). Dalam jangkitan *H. pylori*, pelbagai jenis pengantara keradangan termasuk sitokin dan enzim teraruh akan meningkat. Sesetengah pengantara ini boleh mencederakan mukosa gaster, sementara yang lain terlibat dalam pengawalaturan tindakbalas imun dan integriti mukosa gaster (Bagheri et al. 2016; Crabtree 1996; Fujimoto et al. 2012; Robinson et al. 2015; Wang et al. 2014).

5.7.1 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS PRO-KERADANGAN INTERLEUKIN (IL-1 β , IL-6, IL-12), TUMOR FAKTOR NEKROSIS (TNF- α) DAN INTERFERON- γ (IFN- γ) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Semasa tindakbalas keradangan, beberapa pengantara pro-keradangan dikeluarkan, termasuk interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-12, dan tumor faktor nekrosis (TNF- α). Sitokin-sitokin ini memainkan peranan utama dalam memulakan dan amplifikasi proses keradangan (Álvarez-Arellano 2014; Arachchi et al. 2018; Noach et al. 1994). Dalam kajian ini, kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan aras sitokin IL-1 β , IL-6, IL-12, dan TNF- α yang lebih tinggi dengan signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan normal.

Tindak balas imun dan keradangan perumah terhadap *H. pylori* memainkan peranan penting dalam penghasilan jangkitan. Tindak balas imun penyesuaian kepada *H. pylori* dicirikan dengan perekrutan sel efektor Th1 yang merembeskan sejumlah besar kandungan IFN- γ yang tidak cukup efisien untuk mengawal jangkitan hingga membolehkan pengekalan *H. pylori* berterusan dalam mukosa gaster sepanjang hayat (Bagheri et al. 2018; Bamford et al. 1998). Pengekalan bakteria boleh diaktifkan melalui kehadiran aras sel regulatori T (Tregs) yang tinggi yang menyusup ke dalam mukosa gaster yang dijangkiti, di mana ianya kritikal untuk mengekalkan toleransi imunologi (Cook et al. 2014; Lundgren et al. 2005). Beberapa kajian terdahulu menunjukkan bahawa semasa jangkitan *H. pylori*, terdapat rembesan kuat sitokin yang berbeza seperti IFN- γ dan IL-12 dalam mukosa gaster di mana IFN- γ itu sendiri dapat meningkatkan apoptosis sel epitelium gaster (D'Elios et al. 1997; Raghavan & Quiding-Jarbrink 2012). Kajian Perfetto et al. (2004) menunjukkan peningkatan ekspresi gen iNOS dalam sel AGS yang diaruh *H. pylori* serta menunjukkan kehadiran IFN- γ mempunyai kesan sinergi terhadap ekspresi gen iNOS. Kehadiran IFN- γ dikaitkan dengan peningkatan kadar apoptosis dalam model kajian tersebut. Penemuan kajian tersebut melaporkan bahawa IFN- γ mempunyai kesan dalam meningkatkan keupayaan *H. pylori* untuk memodulasi ekspresi gen iNOS dan meningkatkan kadar apoptosis. Ini menunjukkan bahawa tindak balas imun polarisasi Th1 yang diperolehi dalam kajian secara *in-vivo* boleh menyumbang kepada patogenesis jangkitan *H. pylori* (De Brito et al. 2019; Perfetto et al. 2004).

Keradangan akan menjadi tindakbalas yang kritikal terhadap jangkitan atau tisu yang rosak apabila ia menjadi berlebihan atau tertangguh. Ia boleh menghalang penyembuhan atau menyebabkan lanjutan kerosakan. Literatur yang sedia ada pada masa ini telah menunjukkan bahawa reaksi keradangan telah dimodulasikan dalam kajian awal klinikal, model haiwan, dan kultur sel. Dapatan keradangan yang paling serius adalah disebabkan pengeluaran radikal bebas dalam tisu. Radikal-radikal yang terungkai dimulakan oleh leukosit spesifik yang dirangsang sebagai aspek utama dalam proses keradangan di mana ia merupakan proses keradangan yang mengaktifkan siri proses selular yang menyebabkan mendakan faktor pertumbuhan yang mempengaruhi proliferasi fibroblas, angiogenesis dan sel epitelium (Aziz et al. 2013). Beberapa jenis madu dari negara-negara yang berbeza telah dilaporkan mempunyai kesan antiradang (Amaral et al. 2017; Catchpole et al. 2015; Costa Ferreira da Cruz et al. 2019; Yaghoobi et al. 2013). Dalam kajian ini, kumpulan rawatan madu Tualang mampu menurunkan aras sitokin IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , dan IFN- γ manakala rawatan madu Kelulut menurunkan aras sitokin IL-1 β , IL-6, dan TNF- α dengan signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Dapatan kajian ini bersamaan dengan kajian terdahulu yang melaporkan madu Gelam dapat mengurangkan pengantara keradangan seperti COX-2 dan TNF- α melalui translokasi NF- κ B kepada nukleus seterusnya dapat menghalang pengaktifan laluan NF- κ B (Hussein et al. 2013). Adalah diketahui secara meluas bahawa pengaktifan NF- κ B memainkan peranan penting dalam patogenesis keradangan (Himaya et al. 2011; Reyes-Gordillo et al. 2007). Transkripsi NF- κ B berperanan utama dalam keradangan dengan memodulasi pelbagai gen yang bertanggungjawab untuk generasi pengantara keradangan. Dengan kehadiran pelbagai rangsangan pro-keradangan, perencat kappa B (I κ B) cepat terdegradasi dan subunit NF- κ B menjalani translokasi ke dalam nukleus untuk merangsang transkripsi pelbagai gen yang mengekod kemokin (*chemokines*), sitokin, faktor anti-apoptosis dan faktor pertumbuhan (Lawrence 2009). Kajian terdahulu oleh Gasparrini et al. (2018) melaporkan bahawa madu Manuka juga bertindak sebagai antiradang dengan mengurangkan ekspresi penanda keradangan seperti protein TLR4, NF- κ B, p-I κ B α , iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 dan IL-10 dengan signifikan.

Dalam kajian ini, rawatan terapi tiga serangkai juga menunjukkan penurunan yang signifikan pada aras sitokin keradangan IL-1 β , TNF- α , dan IFN- γ berbandingkan

dengan kumpulan *H. pylori*. Kajian ini juga menunjukkan rawatan terapi tiga serangkai tiada perbezaan yang signifikan jika dibandingkan dengan rawatan madu Tualang dan madu Kelulut dalam menghalang perantara keradangan (IL-1 β , TNF- α dan IFN- γ). Omeprazole dalam kombinasi dengan antibiotik berkesan membasmi jangkitan *H. pylori*. Walau bagaimanapun, bukti menunjukkan bahawa rawatan Omeprazole sendiri boleh menyebabkan kecederaan akut dan kronik kepada sel-sel kelenjar gaster. Kajian terdahulu telah melaporkan bahawa Omeprazole membawa kepada kemerosotan akut sel-sel parietal, peningkatan perolehan sel parietal, dan pengumpulan sel-sel keradangan kronik (Amaral et al. 2017; Karam & Forte 1994; Kohler et al. 2010; Llorente et al. 2017). Dalam kajian klinikal, penggunaan Omeprazole sahaja sebagai rawatan untuk *H. pylori* gastritis juga telah dilaporkan meningkatkan keradangan mukosa. Keradangan yang berpanjangan, seterusnya, membawa kepada kemusnahan kelenjar gaster dan hipergastrinemia berterusan, keadaan yang dikenali sebagai gaster atrofik. Gaster atrofik yang terhasil daripada monoterapi Omeprazole dalam penetapan jangkitan *H. pylori* kronik telah dikaitkan dengan peningkatan risiko displasia mukosa dan kanser gaster (Higuchi et al. 2012; Ernst J. Kuipers et al. 1996; S. et al. 2018). Kombinasi antibiotik dengan perencat pam proton dalam rawatan terhadap *H. pylori* juga menyebabkan kerintangan antibiotik yang telah meningkat di kalangan strain patogen (Nayar 2018; O'Connor et al. 2010; Thung et al. 2016). Oleh itu, memandangkan tahap kecekapan, kos yang tinggi dan kesan sampingan yang berkaitan, beberapa penyelidikan telah dijalankan ke atas produk semulajadi, sama ada dari asal-usul tumbuhan atau haiwan, yang bertujuan untuk pengesanan dan pencirian sebatian kimia dengan sifat antimikrob dan antiradang (Carson & Riley 2003; Bonacorsi et al. 2009; Ayala et al. 2014). Ekstrak tumbuhan dan madu adalah antara sumber ubat-ubatan baru yang paling menarik dan telah menunjukkan hasil yang berkesan ke atas rawatan ulser gaster, di mana kadar pengurangannya dilaporkan dari awal rawatan yang berfungsi sebagai penanda penawar kepada penyakit (Bonacorsi et al. 2009; Keenan et al. 2010).

5.7.2 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS ANTIRADANG INTERLEUKIN (IL-4 DAN IL-10) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Dalam kajian ini, selain daripada IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α dan IFN- γ , kandungan protein sitokin antiradang lain seperti IL-4, dan IL-10 juga telah diukur. Interleukin-4 (IL-4) merupakan sitokin pleiotropi yang dihasilkan oleh T limfosit teraktif, sel masta, dan basofil, di mana ianya mengawal spektrum fungsi yang luas dalam B-sel, T-sel, makrofaj, dan jenis-jenis sel lain. IL-4 menggalakkan proliferasi dan diferensiasi T-sel kepada IL-4-menghasilkan T-sel bantu Th2 atau Th0 (Luzina et al. 2012; W. E. Paul 1991; Zamorano et al. 2003). Dapatan dalam kajian ini turut menunjukkan peningkatan aras sitokin IL-4 yang lebih tinggi dengan signifikan pada kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) berbanding dengan kumpulan kawalan normal. Dalam gastritis kronik bukan ulser yang disebabkan oleh jangkitan *H. pylori* biasanya menimbulkan tindakbalas T-sel setempat dengan profil sel Th0 predominan dan pengeluaran IFN- γ dan IL-4, di mana ia mengakibatkan tindak balas sel Th1 berkutub (*polarized*) pada pesakit ulser peptik (Bamford et al. 1998; Booth et al. 2015; D'Elios et al. 1997; Karttunen et al. 1995; Lopes et al. 2005). Kajian-kajian terdahulu mencadangkan bahawa jenis tindakbalas T-sel perumah, bersama-sama dengan faktor-faktor virulens bakteria yang dikodkan oleh gen *cag PAI*, boleh menyumbang kepada dapatan klinikal akibat jangkitan *H. pylori* (Orsini et al. 2000; Salih et al. 2007; Sgouras et al. 2015).

IL-10 adalah sitokin antiradang yang mengawal atur penurunan tindakbalas imun perantara dan tindakbalas keradangan sitotoksik (Kim et al. 2012). Jangkitan *H. pylori* boleh membawa kepada peningkatan kawal atur sitokin IL-10 sebagai cara untuk menyekat tindakbalas imun yang cekap, yang kemudiannya memihak kepada jangkitan dan kelangsungan parasit (Assis et al. 2014). Kajian ini menunjukkan kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) menunjukkan peningkatan aras sitokin IL-10 yang lebih tinggi dengan signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan normal. Strain *cagA H. pylori* mengaruh rembesan predominan IL-10, manakala jika tiada CagA pada *H. pylori*, aras IL-10 yang lebih rendah diperhatikan (Tanaka et al. 2010). Kajian sebelum ini melaporkan bahawa *H. pylori* didapati mengaruh pengeluaran IL-10 melalui p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan NF- κ B hiliran DC-SIGN, TLR2, dan TLR4 dengan memberi isyarat pada dendritik (L. L. Chang et al. 2012). Kajian oleh

Kaebisch et al. (2014) juga menunjukkan bahawa TLR4 dan TLR2 memainkan peranan penting dalam mengawal atur IL-10 yang dirembeskan oleh dendritik. Selanjutnya, peningkatan aras ekspresi IL-10 juga telah dikesan pada pesakit CagA-positif *H. pylori* (Assis et al. 2014; Hida et al. 1999).

Walau bagaimanapun, dapatan dalam kajian ini pada kumpulan rawatan madu Tualang menunjukkan penurunan aras sitokin IL-4 dan IL-10 yang signifikan, manakala rawatan madu Kelulut menunjukkan penurunan aras sitokin IL-4 berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Kajian terbaharu oleh Minden-Birkenmaier et al. (2020) telah memeriksa kesan madu Manuka pada kepekatan 0.5% dapat mengurangkan pembebasan sitokin IL-4. Madu mempunyai keupayaan untuk menghalang ekspresi sitokin antiradang seperti IL-10, faktor pertumbuhan yang diperolehi platelet (PDGF) dan transformasi faktor pertumbuhan- β (TGF- β) Di mana ia dilaporkan dalam model *in-vitro* titisan sel *mono mac 6* (MM6) menggunakan 1% larutan madu (Sarfraz Ahmed et al. 2018; Tonks et al. 2001). Madu menghentikan pembebasan ROS yang dihasilkan oleh makrofaj, monosit, dan neutrofil yang menyebabkan keradangan berlaku untuk menggalakkan kesan antiradang. Ia juga menghalang pengeluaran keratinosit dan leukosit untuk mengurangkan keradangan. Telah ditunjukkan bahawa dalam tindak balas keradangan pengeluaran H₂O₂ oleh madu merangsang pertumbuhan fibroblas dan sel epitelium untuk memperbaiki kerosakan keradangan. Tindakan antiradang madu ini menjadikannya agen novel untuk memodulasi penyakit (Amaral et al. 2017; Gupta et al. 2011; Molan 2001; Tomblin et al. 2014; Tsang et al. 2015). Kesan antiradang madu boleh dikaitkan dengan sebatian fenolik dan flavonoid (Borsato et al. 2014; Candiracci et al. 2012; Hämäläinen et al. 2007). Laporan daripada kajian Majtan (2014) telah membuat teori bahawa kesan imunomodulatori madu bergantung kepada keadaan keradangan luka, di mana madu meningkatkan keradangan dalam luka akut tetapi menurunkan keradangan dalam luka kronik dengan kehadiran madu. Hipotesis ini akan menjelaskan beberapa kesan kajian sebelum ini, bahawa madu Manuka mengurangkan pelepasan Proteinase 3 dalam *differentiated Human Leukemia-60* (dHL-60) yang dirangsang oleh LPS (Minden-Birkenmaier et al. 2020).

5.8 KESAN MADU TUALANG DAN MADU KELULUT KE ATAS FAKTOR PERTUMBUHAN VASKULAR ENDOTELIAL (VEGF) DALAM LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Tindakbalas keradangan gaster boleh berlaku sama ada dalam keadaan akut atau kronik. Mekanisme umum yang terlibat dalam patogenesis lesi epitelium keradangan dan ulser adalah neoangiogenesis iaitu pembangunan saluran darah baru daripada prekursor endotelium yang sedia ada. VEGF merupakan faktor angiogenik yang memainkan peranan utama dalam proses pelbagai aras yang membawa kepada pembinaan semula mukosa normal dengan merangsang proses angiogenesis, di mana ia memastikan tisu penyembuhan menerima bekalan nutrien yang mencukupi (Ferrara 2009; Papetti & Herman 2002; Ziyad & Iruela-Arispe 2011). Selain itu, VEGF memainkan peranan penting dalam angiogenesis mikrovaskular yang berkaitan dengan tumor dan ianya telah dilaporkan diekspreskan secara berlebihan dalam karsinoma gaster (Goel & Mercurio 2013; Hicklin & Ellis 2005; Li et al. 2017; Prager & Zielinski 2013; Ziyad & Iruela-Arispe 2011). Terdapat bukti yang menunjukkan bahawa ekspresi VEGF berkait rapat dengan prognosis yang lemah dan kesan buruk pada ciri-ciri klinikal kanser gaster seperti invasi tumor, metastasis nodus limfa dan *H. pylori* yang meningkatkan kawal atur ekspresi VEGF dalam sel epitelium gaster. Beberapa mekanisme seperti NF- κ B, cyclooxygenase-2 (COX-2), dan pengisyaratan reseptor faktor pertumbuhan epidermal (EGFR) dianggap sebagai perantara *H. pylori* yang mengaruh pengeluaran VEGF dalam sel epitelium gaster (Kang et al. 2014).

Kajian ini menunjukkan peningkatan aras sitokin VEGF yang lebih tinggi dengan signifikan pada kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*) berbanding dengan kumpulan kawalan normal. Hasil kajian yang diperolehi sama dalam beberapa kajian lalu yang telah melaporkan peningkatan ekspresi VEGF dalam gaster tikus aruhan *H. pylori* (Kang et al. 2014; Li et al. 2017; Siregar et al. 2017; Tuccillo et al. 2005). Kajian oleh Tuccillo et al. (2005) melaporkan peningkatan ekspresi VEGF pada mukosa dalam gastritis aruhan *H. pylori*. Tambahan pula, kajian oleh Siregar et al. (2017) mendapati bahawa aras VEGF pada serum dalam kumpulan yang dijangkiti jauh lebih tinggi berbanding *H. pylori* negatif. Kajian terdahulu oleh penyelidik yang sama pada tahun 2015 juga melaporkan bahawa *H. pylori* boleh meningkatkan aras serum VEGF (Siregar et al. 2015). VEGF adalah pengawal atur angiogenesis yang penting dalam keradangan

dan beberapa ujian klinikal sedang dijalankan untuk menguji hipotesis bahawa perencatan aktiviti VEGF mungkin bermanfaat untuk menyekat tumor dan penyakit lain yang berkaitan dengan angiogenesis (Ferrara 2009; Folkman 2002; Hicklin & Ellis 2005). Maka dalam kajian ini, kepekatan VEGF berperanan sebagai penanda dan juga untuk mengesahkan angiogenesis dalam inflamsi.

Rawatan madu Tualang dan madu Kelulut dalam kajian ini menunjukkan penurunan kepekatan VEGF dengan signifikan berbanding kumpulan kawalan negatif (*H. pylori*). Kajian terdahulu oleh Eteraf-Oskouei et al. (2013) melaporkan rawatan dengan madu mengurangkan kepekatan VEGF dalam eksudat keradangan dan ia mungkin memainkan peranan penting dalam mengurangkan angiogenesis keradangan. Hasil dapatan kajian oleh Lu et al. (2000) menunjukkan bahawa dalam perencatan VEGF secara langsung atau dengan mensasarkan reseptornya, membawa kepada penurunan aktiviti penyakit dalam model haiwan artritis. Sebatian fenolik yang terdapat pada madu berkemungkinan menyumbang kepada penurunan kepekatan VEGF dan aktiviti anti-angiogeniknya (Eteraf-Oskouei et al. 2013). Umumnya, terdapat sebahagian mekanisme tindakan madu yang masih kurang dipahami dengan jelas, namun madu mengandungi pelbagai jenis bahan seperti vitamin E (Alvarez-Suarez et al. 2013). Sebahagian bahan madu ini mungkin relevan sebagai kesan anti-angiogenik. Beberapa kajian telah melaporkan sifat anti-angiogenik pada sebatian vitamin E (Abraham et al. 2019; Miyazawa et al. 2004, 2009).

Kajian terdahulu menunjukkan bahawa PPI mempunyai aktiviti perencat yang signifikan terhadap angiogenesis aruhan *H. pylori*. Penyekatan H⁺ oleh PPI menyebabkan peningkatan pada ekstraselular pH (lumen gaster) dan penurunan pada intraselular pH. Peningkatan pH pada ruang ekstraselular boleh meningkatkan mikropersekitaran hipoksik di kawasan sel epitelium gaster serta mengganggu *H. pylori* yang mengaruh isyarat intraselular melalui perencatan pengaktifan MAPK (Sachs et al. 2010; Yeo et al. 2006). Walau bagaimanapun, tiada perbezaan yang signifikan diperhatikan dalam kajian ini akibat pemberian terapi tiga serangkai, yang mencadangkan tidak semua PPI mempunyai kesan pada faktor pertumbuhan ini. Kajian terdahulu oleh Souza et al. (2009) melaporkan dapatan kajian yang sama, iaitu rawatan terapi tiga serangkai mampu mengurangkan lesi gaster tetapi tidak dengan ekspresi

VEGF. Berbeza dengan terapi tiga serangkai, hasil kajian ini menunjukkan rawatan madu Tualang dan madu Kelulut telah menyebabkan penurunan kepekatan VEGF aruhan *H. pylori*. Maka pemberian madu Tualang dan madu Kelulut dalam kajian ini mungkin dapat membantu melindungi mukosa gaster aruhan *H. pylori* dengan perencatan ekspresi faktor pertumbuhan ini.

5.9 PERBINCANGAN KESELURUHAN KE ATAS RAWATAN MADU TUALANG DAN KELULUT KE ATAS LESI GASTER ARUHAN *H. PYLORI*

Jangkitan *H. pylori* telah menjadi asas kajian dalam menangani gastritis, ulser gaster dan kanser gaster selepas penemuan yang dibuat oleh Marshall dan Warren pada tahun 1983. Kajian mengenai epidemiologi, genetik, patofisiologi dan rawatan ke atas *H. pylori* sering dilaporkan dalam tempoh tiga dekad yang lalu. *H. pylori* dilengkapi dengan beberapa faktor penting seperti flagela, faktor pengkolonian, enzim urease dan peroksida serta sitotoksin berkaitan gen A (*cag A*), pepulau kepatogenan (*cag-PAI*) dan membentuk vakuol sitotoksin A (*vac A*) yang menjadikannya agen yang sangat berkesan dalam menghalang sistem imun dan kerintangan terhadap antimikrob (Kao et al. 2016; Mejías-Luque & Gerhard 2017).

Antibiotik telah dibuktikan berkesan sebagai rawatan ke atas jangkitan *H. pylori* yang menyebabkan penurunan yang signifikan ke atas kadar gastritis, ulser gaster dan kanser gaster yang berkaitan dengan jangkitan ini. Perencat pam proton Omeprazole dan dua antibiotik Clarithromycin dan Amoxicillin adalah rawatan piawai terapi tiga serangkai yang digunakan dalam pembasmian awal jangkitan *H. pylori* (Fashner & Gitu 2015; O'Morain et al. 2018). Walau bagaimanapun, penggunaan antibiotik telah menimbulkan kebimbangan kerana kerintangan yang muncul dalam dua dekad yang lalu telah menyebabkan pencarian pilihan terapeutik alternatif. Madu telah digunakan selama beribu-ribu tahun dahulu sebagai produk makanan dan ubat herba untuk merawat beberapa penyakit kerana sifat penyembuhannya. Pada masa kini, kebanyakan penyelidik telah menilai semula kualiti pemakanan dan terapeutiknya dan telah melaporkan secara klinikal kesan antimikrob, antiradang, antioksidan, antikanser dan antidiabetik dalam penggunaan madu ini (Erejuwa et al. 2010, 2011; Munshi 2014; Sherlock et al. 2010; Tsang et al. 2015). Oleh itu, kesan-kesan ini membawa kepada kajian ini dalam mencari rawatan semula jadi dan alternatif. Maka, kajian ini telah

dijalankan untuk mengkaji kesan madu Tualang dan madu Kelulut ke atas jangkitan *H. pylori* secara *in-vitro* dan *in-vivo*.

Dapatan kajian *in-vitro* AST ini menunjukkan keputusan madu Tualang dan madu Kelulut pada kepekatan yang berbeza (10 %, 20 %, 50 %, 75 % (v/v)) memberikan pelbagai aras aktiviti antibakteria ke atas bakteria *H. pylori* dari segi zon saiz perencatan. Kepekatan madu yang tinggi akan meningkatkan saiz zon perencatan dengan signifikan apabila dibandingkan dengan kepekatan madu lain. Analisis histopatologi gaster membolehkan kita untuk memerhatikan kolonisasi *H. pylori* dan perubahan keradangan di bahagian mukosa gaster. Kedua-dua faktor virulens bakteria dan tindakbalas keradangan perumah menyumbang kepada kerosakan mukosa semasa jangkitan *H. pylori*. Terdapat beberapa kajian melaporkan strain *H. pylori* yang memiliki gen *Cag A* dan *Vac A* adalah lebih virulens dan berkait rapat dengan keparahan simptom gastrousus (Hanafiah Alfizah et al. 2012; Manente et al. 2008; Yamaoka 2010). Kajian ini menunjukkan kerosakan mukosa gaster tikus yang meluas kepada permukaan epitelium dan peningkatan purata skor yang signifikan pada tikus aruhan *H. pylori*. Pemberian rawatan madu Tualang dan madu Kelulut selama 14 hari, menunjukkan pembaikan terhadap struktur histologi permukaan epitelium yang lebih baik pada tikus lesi gaster aruhan *H. pylori*. Dalam kajian ini, pemberian *H. pylori* secara oral (10^8 CFU/ml setiap tikus) sebanyak dua kali sehari selama tujuh hari berturut-turut menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam rembesan asid gaster (jumlah keasidan) berikutan induksi lesi gaster. Pesakit yang mendapat jangkitan *H. pylori* mengalami peningkatan yang signifikan dalam pengeluaran asid yang merupakan faktor utama dalam patogenesis ulser gaster (Lillehoj et al. 2012; O'Toole et al. 2005). Walau bagaimanapun, apabila dirawat dengan madu Tualang dan madu Kelulut, rembesan asid menurun dengan signifikan selepas mendapat 14 hari rawatan, menunjukkan kesan yang bermanfaat sebagai peranan anti-sekretorinya.

Oksigen radikal bebas merangsang pemperoksidaan lipid dan dianggap sebagai punca utama kemerosotan membran sel dan kecederaan sel. MDA yang merupakan produk peroksida lipid menunjukkan peningkatan yang signifikan pada tikus aruhan *H. pylori*. Oleh itu, kehadiran aras MDA pada tisu gaster tikus mencadangkan peningkatan kerosakan tisu kerana fungsi antioksidan yang terjejas dalam pengendalian tekanan

oksida dan radikal bebas. Kajian ini mendapati bahawa rawatan madu Tualang dan madu Kelulut, dapat mengganggu proses oksidatif melalui pengurangan aras radikal bebas dengan menurunkan aras MDA dan meningkatkan aras enzim antioksidan GPx, SOD, dan CAT dalam rawatan lesi gaster aruhan *H. pylori*. *H. pylori* menyebabkan mobilisasi dan pengaktifan monosit dan neutrofil yang menjana spesies oksigen reaktif (ROS) seperti radikal anion superoksida, hidrogen peroksida, dan akhirnya radikal hidroksi dan apoptosis yang dipertingkatkan dalam mukosa gaster (Calvino-Fernández et al. 2008; Handa et al. 2010). Jangkitan ini menyebabkan perumah makrofaj dan leukosit nuklear polimorfik menyumbang kepada pengeluaran nitrik oksida sintase teraruh (iNos). DNA boleh dimusnahkan oleh nitrik oksida yang dikeluarkan oleh sel-sel ini yang menyusup ke dalam mukosa gaster (Cherdantseva et al. 2014). Dapatan kajian ini menunjukkan aktiviti pengekspresan mRNA iNOS dan kandungan NO yang tinggi dalam kumpulan kawalan negatif. Kajian ini menunjukkan bahawa dengan rawatan madu Tualang dan madu Kelulut dapat menurunkan dengan signifikan pengekspresan mRNA iNOS dan kandungan NO ke atas lesi gaster aruhan *H. pylori*. Dapatan kajian yang diperolehi menunjukkan bahawa rawatan dengan madu Tualang dan madu Kelulut adalah selamat terhadap tikus *Sprague Dawley* yang digunakan dan menunjukkan kematian sifar. Madu Tualang dan madu Kelulut membalikkan kesan kecederaan oksidatif dan keradangan dalam mukosa gaster dan memudahkan kesembuhan lesi gaster.

H. pylori membawa risiko morbiditi yang signifikan sepanjang hayat dan dikaitkan dengan tekanan oksidatif dengan menjana molekul oksigen reaktif dan kerosakan DNA oksidatif dalam mukosa gaster (Hagag, Amin, EL-Fiky, et al. 2018). Kajian semasa ini dapat menunjukkan bahawa dengan inokulasi *H. pylori* menyebabkan penurunan signifikan dalam aktiviti enzim SOD, CAT dan GPx pada kumpulan kawalan negatif. Dapatan kajian ini jelas menunjukkan dengan peningkatan aras faktor pro-oksidatif akan menyebabkan penurunan pada aras antioksidan dalam tekanan oksidatif yang tinggi boleh memodulasi beberapa proses epitelium gaster. Dalam kajian ini, madu Kelulut dapat menghasilkan peningkatan yang signifikan ke atas aktiviti antioksidan enzim SOD, CAT dan GPx. Manakala madu Tualang mampu meningkat dengan signifikan dalam aktiviti SOD sahaja, tetapi bukan pada enzim CAT dan GPx.

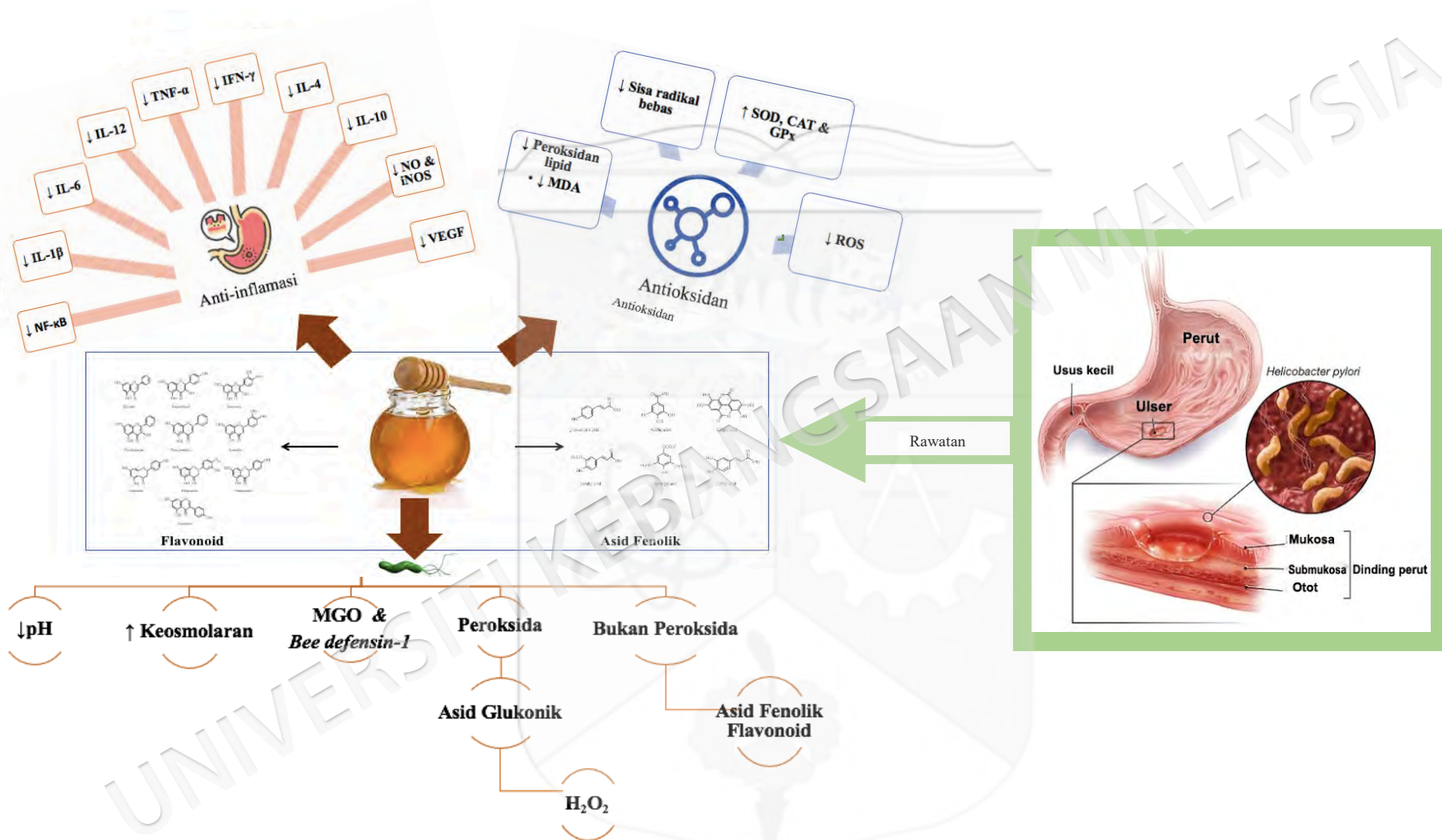
Penemuan ini mendedahkan bahawa madu Kelulut memaparkan aktiviti antioksidan yang kuat berbanding madu Tualang.

H. pylori merangsang tindakbalas imun yang kuat, merangsang ekspresi sitokin dan kemokin daripada sel-sel epitelium gaster. Faktor-faktor ini menarik neutrofil, makrofaj, sel dendritik (DC), sel pembunuh semulajadi (NK), dan limfosit serta mengaruh pembebasan spesies oksigen reaktif (ROS) dan spesies nitrogen reaktif (RNS) (Figueiredo et al. 2014; Robinson et al. 2015). Dapatan kajian ini menunjukkan perubahan keradangan pada mukosa gaster aruhan *H. pylori*, iaitu dengan peningkatan kandungan protein sitokin pro-keradangan IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ dan sitokin antiradang IL-4 dan IL-10. Dapatan daripada kajian ini dan kajian terdahulu berpendapat bahawa rembesan sitokin antiradang daripada mukosa antral dalam jangkitan *H. pylori* menyebabkan rembesan endogen IL-4 dan IL-10 sebagai cara untuk menyekat tindakbalas imun terhadap jangkitan dan menghadkan kerosakan tisu yang kemudiannya berpotensi menyumbang ke arah kegagalan tindakbalas imun untuk menyingkirkan organisma (Assis et al. 2014). Dalam kajian ini, kumpulan rawatan madu Tualang mampu menurunkan kandungan protein sitokin pro-keradangan IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , dan IFN- γ dan antiradang IL-4 dan IL-10, manakala rawatan madu Kelulut menurunkan kandungan protein sitokin pro-keradangan IL-1 β , IL-6, dan TNF- α dan antiradang IL-4 dengan signifikan. Penemuan ini mendedahkan bahawa madu Tualang memaparkan aktiviti antiradang yang kuat berbanding madu Kelulut.

VEGF merupakan pusat pengawal atur angiogenesis dan vaskulogenesis. Terdapat bukti yang menunjukkan bahawa pengekspresan VEGF berkait rapat dengan prognosis yang lemah dan ciri-ciri klinikal kanser gaster yang buruk seperti tumor invasi dan metastasis nodus limfa dan jangkitan *H. pylori* meningkatkan pengekspresan VEGF dalam sel-sel epitelium gaster (Li et al. 2017; Liu et al. 2014; Siregar et al. 2017). Maka dalam kajian ini, peningkatan kepekatan VEGF dalam tikus aruhan *H. pylori* berperanan sebagai penanda dan juga untuk mengesahkan angiogenesis dalam keradangan. Walau bagaimanapun rawatan madu Tualang dan madu Kelulut dalam kajian ini mampu menurunkan kepekatan VEGF dengan signifikan. Pembasmian *H. pylori* dalam kajian ini mampu menyembuhkan kedua-dua jangkitan dan lesi gaster. Walaupun terdapat sedikit perbezaan dalam keberkesanan madu Tualang dan madu

Kelulut dalam melawan jangkitan, namun, secara keseluruhan rawatan madu Tualang dan Kelulut dalam kajian ini mampu bertindak sebagai antibakteria, antioksidan dan antiradang ke atas lesi gaster aruhan *H. pylori*. Hal ini kerana terdapat beberapa variasi dalam komposisi atau kualiti madu Tualang dan madu Kelulut ini mungkin disebabkan oleh beberapa faktor seperti asal-usul bunga, akar botani, cuaca, geografi dan kaedah penuaian serta pemprosesan madu (Abu Bakar et al. 2017).





Rajah 5.1

Ringkasan kesan-kesan madu Tualang dan madu Kelulut yang terlibat dalam penyembuhan lesi gaster aruhan *H. pylori*
Ubah suai daripada Ahmed et al.(2018)

BAB VI

KESIMPULAN

6.1 KESIMPULAN

Kajian ini telah mencapai semua objektif kajian dalam mengkaji keberkesanan madu Tualang dan madu Kelulut melalui penentuan aktiviti anti-*H. pylori* secara *in-vitro* serta *in-vivo*. Dari dapatan kajian ini boleh disimpulkan bahawa:

1. Madu Tualang dan madu Kelulut menunjukkan potensi anti-*H. pylori* pada setiap kepekatan (10 %, 20 %, 50 %, 75 % (v/v)) dalam ujian *in-vitro*. Kepekatan madu Tualang dan madu Kelulut sebanyak 75 % (v/v) menunjukkan zon perencatan yang tertinggi dengan signifikan berbanding dengan kepekatan-kepekatan yang lain. Namun, tiada perbezaan yang signifikan apabila dibandingkan dengan ubat piawai Clarithromycin dalam ujian *in-vitro*.
2. Aruhan *H. pylori* sebanyak 2 kali sehari selama 7 hari pada tikus kajian menyebabkan pembentukan lesi gaster dan peningkatan skor histologi mukosa gaster. Pemberian madu Tualang dan madu Kelulut (2 g/kg berat tikus) sebanyak 2 kali sehari selama 14 hari telah mengurangkan kecederaan pada mukosa gaster seperti yang diperhatikan pada histologi permukaan epitelium tikus dengan lesi gaster aruhan *H. pylori*, setanding dengan terapi piawai tiga serangkai (Clarithromycin (51.37 mg/kg berat tikus), Amoxicillin (102.80 mg/kg berat tikus) dan Omeprazole (2.035 mg/kg berat tikus)). Walau

bagaimanapun, hanya madu Kelulut berkesan menurunkan skor histologi mukosa gaster dalam keadaan lesi gaster aruhan *H. pylori*.

3. Pemberian madu Tualang dan madu Kelulut dapat melindungi mukosa gaster daripada kecederaan dengan menurunkan keasidan dalam tikus aruhan *H. pylori* dengan signifikan, setanding dengan terapi piawai tiga.
4. Pemberian madu Tualang dan madu Kelulut melindungi gaster daripada lesi gaster aruhan *H. pylori* dengan mengurangkan peroksidasi lipid (MDA), setanding dengan terapi piawai tiga serangkai. Madu Tualang dan madu Kelulut juga meningkatkan aktiviti enzim antioksidan SOD dan GPx. Walau bagaimanapun hanya madu Kelulut yang berkesan meningkatkan aktiviti CAT dalam keadaan lesi gaster aruhan *H. pylori*. Namun, kesan serupa tidak diperhatikan pada pemberian terapi piawai tiga serangkai.
5. Rawatan dengan madu Tualang dan madu Kelulut menurunkan peningkatan NO dalam tisu gaster tikus aruhan *H. pylori*, melalui mengawal-atur gen iNOS dengan mengurangkan regulasi menaik gen ini. Namun, kesan serupa tidak diperhatikan pada pemberian terapi piawai tiga serangkai.
6. Pemberian madu Tualang dan madu Kelulut melindungi gaster dengan mengawal-atur protein sitokin (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ) dalam keadaan lesi gaster aruhan *H. pylori*. Iaitu dengan menurunkan kandungan sitokin keradangan (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, TNF- α dan IFN- γ). Walau bagaimanapun hanya madu Tualang yang berkesan mengurangkan sitokin antiradang IL-10 dalam keadaan lesi gaster aruhan *H. pylori*. Kesan yang serupa diperhatikan dengan pemberian terapi piawai tiga serangkai pada kandungan sitokin keradangan IL-1 β , TNF- α dan IFN- γ .
7. Pemberian madu Tualang dan madu Kelulut melindungi gaster dengan mengawal-atur ekspresi faktor pertumbuhan kandungan protein VEGF dalam keadaan lesi gaster aruhan *H. pylori*. Namun, kesan serupa tidak diperhatikan pada pemberian terapi piawai tiga serangkai.

Kesimpulannya, dapatan kajian ini menunjukkan bahawa penyembuhan lesi gaster yang berkesan memerlukan mekanisma yang melibatkan supresi asid gaster, pembasmian *H. pylori*, penghapusan tekanan oksidatif serta pengawal-aturan keradangan. Madu Tualang dan madu Kelulut mempunyai potensi penyembuhan yang setanding dengan terapi piawai tiga serangkai dalam mengurangkan kecederaan mukosa gaster akibat jangkitan *H. pylori*. Kesan positif madu Tualang dan Kelulut adalah melalui aktiviti antibakteria, antiradang dan antioksidan yang berpotensi sebagai ejen terapeutik alternatif tambahan terhadap lesi gaster aruhan *H. pylori*.

6.2 LIMITASI KAJIAN

Terdapat beberapa limitasi yang perlu dipertimbangkan dalam kajian ini, sekali gus menjadikan ia sebagai siasatan lanjutan untuk membina pemahaman lengkap mengenai komponen aktif madu Tualang dan madu Kelulut ke atas lesi gaster aruhan *H. pylori*. Limitasi kajian yang terdapat dalam kajian ini adalah seperti berikut:

1. Kajian ini hanya mengkaji kesan anti-*H. pylori* dalam kajian *in-vitro* dan menggunakan madu Tualang dan madu Kelulut yang mentah (tidak diekstrak) tanpa menggunakan bahan aktif komponen antibakteria dalam membandingkan kesan antibakteria dengan rawatan piawai antibiotik (Clarithromycin) terhadap *H. pylori*.
2. Kajian ini hanya menunjukkan penghasilan model lesi gaster aruhan *H. pylori* tikus, atas kekangan jangka masa kajian. Oleh itu, kajian lanjutan diperlukan untuk mendapatkan jangka masa induksi yang berkesan untuk menghasilkan model ulser gaster aruhan *H.pylori* tikus dalam mengkaji kesan anti-ulser madu Tualang dan madu Kelulut.

6.3 CADANGAN KAJIAN

Terdapat beberapa cadangan kajian lanjutan untuk membina pemahaman lengkap mengenai komponen aktif madu Tualang dan madu Kelulut ke atas lesi gaster aruhan *H. pylori*. Cadangan yang terdapat dalam kajian ini adalah seperti berikut:

1. Menyelidik keberkesanan madu Tualang dan madu Kelulut sebagai agen antibakteria, antiradang & antioksidan dalam merawat lesi gaster aruhan *H. pylori* dan membandingkan kesan ini dengan dadah yang digunakan secara klinikal.
2. Kajian lanjut perlu dilakukan untuk mengenal pasti komponen aktif madu Tualang dan madu Kelulut yang bertindak sebagai antibakteria, antiradang & antioksidan yang mungkin merupakan sumber nutraseutikal dan bahan-bahan perubatan yang menarik.
3. Menjalankan kajian bioavailabiliti bagi mengenalpasti kepekatan dos sebenar yang menunjukkan kesan terhadap parameter kajian. Seterusnya, analisis toksikologi komponen madu Tualang dan madu Kelulut juga perlu dilakukan.
4. Walaupun didapati berkesan dalam mengurangkan lesi gaster aruhan *H. pylori* pada haiwan kajian, kajian lanjut perlu dilakukan bagi mengkaji kesan madu Tualang dan Kelulut pada manusia sebagai salah satu rawatan alternatif tambahan atau pencegahanjangkitan *H. pylori* masa depan.

RUJUKAN

- Abed, M.N., Alassaf, F.A., Jasim, M.H.M., Alfahad, M. & Qazzaz, M.E. 2020. Comparison of Antioxidant Effects of the Proton Pump-Inhibiting Drugs Omeprazole, Esomeprazole, Lansoprazole, Pantoprazole, and Rabeprazole. *Pharmacology* 105(11–12): 645–651.
- Abdel-Latif, M.M. 2015. Chemoprevention of gastrointestinal cancers by natural honey. *World Journal of Pharmacology* 4(1):160.
- Abdel-Latif, M.M.M. & Abouzied, M.M. 2016. Molecular mechanisms of natural honey against *H. pylori* infection via suppression of nf-kb and ap-1 activation in gastric epithelial cells. *Archives of Medical Research* 47(5): 340–348.
- Abdulwahid Ajibola, Joseph P Chamunorwa & Kennedy H Erlwanger. 2012. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition and Metabolism* 9(61): 1–12.
- Abraham, A., Kattoor, A.J., Saldeen, T. & Mehta, J.L. 2019. Vitamin E and its anticancer effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(17):2831–2838.
- Abu Bakar, M.F., Sanusi, S.B., Abu Bakar, F.I., Cong, O.J. & Mian, Z. 2017. Physicochemical and antioxidant potential of raw unprocessed honey from malaysian stingless bees. *Pakistan Journal of Nutrition* 16(11): 888–894.
- Aguilera-Castro, L., Martín-de-Argila-dePrados, C. & Albillos-Martínez, A. 2016. Practical considerations in the management of proton-pump inhibitors. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patología Digestiva* 108(3):145–153.
- Ahmed, Sarfarz & Othman, N.H. 2013. Review of the medicinal effects of Tualang honey and a comparison with Manuka honey. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 6–13.
- Ahmed, Sarfraz, Sulaiman, S.A., Baig, A.A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., Jabeen, S., Shamim, N. & Othman, N.H. 2018. Honey as a potential natural antioxidant medicine: an insight into its molecular mechanisms of action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Al Batran, R., Al-Bayaty, F., Jamil Al-Obaidi, M.M., Abdualkader, A.M., Hadi, H.A., Ali, H.M. & Abdulla, M.A. 2013. *In-vivo* antioxidant and antiulcer activity of *Parkia speciosa* ethanolic leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *PLoS ONE* 8(5):e64751.
- Al-Hatamleh, M.A.I., Boer, J.C., Wilson, K.L., Plebanski, M., Mohamud, R. & Mustafa, M.Z. 2020. Antioxidant-based medicinal properties of stingless bee products: recent progress and future directions. *Biomolecules* 10(6): 1–28.

- Al-Mamary, M., Al-Meer, A. & Al-Habori, M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research* 22(9): 1041-1047.
- AL-Waili, N., Al Ghamdi, A., Ansari, M.J., Al-Attal, Y., Al-Mubarak, A. & Salom, K. 2013. Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of Medical Research* 44(4):307-16.
- Al-Waili, N.S. & Boni, N.S. 2003. Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *Journal of Medicinal Food* 6(2):129-133.
- Alanko, J., Riutta, A., Holm, P., Mucha, I., Vapaatalo, H. & Metsä-Ketelä, T. 1999. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: Relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine* 26(1-2):193-201.
- Alarcón-Millán, J., Fernández-Tilapa, G., Cortés-Malagón, E.M., Castañón-Sánchez, C.A., De Sampedro-Reyes, J., Cruz-del Carmen, I., Betancourt-Linares, R. & Román-Román, A. 2016. Clarithromycin resistance and prevalence of *Helicobacter pylori* virulent genotypes in patients from Southern México with chronic gastritis. *Infection, Genetics and Evolution* 44:190-198.
- Alfizah, H., Am, R., Aminuddin, A., Ay, J. & Ramelah, M. 2010. Four year analysis of *Helicobacter pylori* infection among patients with dyspepsia at Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre 5(1): 13–21.
- Alfizah, Hanafiah, Ramelah, M., Rizal, A.M., Anwar, A.S. & Isa, M.R. 2012. Association of Malaysian *Helicobacter pylori* virulence polymorphisms with severity of gastritis and patients' ethnicity. *Helicobacter* 17(5): 340–349.
- Allen, L.A.H., Schlesinger, L.S. & Kang, B. 2000. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 191(1):115-28.
- Almasaudi, S.B., Abbas, A.T., Al-Hindi, R.R., El-Shitany, N.A., Abdel-Dayem, U.A., Ali, S.S., Saleh, R.M., Al Jaouni, S.K., Kamal, M.A. & Harakeh, S.M. 2017. Manuka honey exerts antioxidant and anti-inflammatory activities that promote healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2017: 1–13.
- Almasaudi, S.B., El-Shitany, N.A., Abbas, A.T., Abdel-Dayem, U.A., Ali, S.S., Al Jaouni, S.K. & Harakeh, S. 2016. Antioxidant, anti-inflammatory, and antiulcer potential of Manuka honey against gastric ulcer in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016.
- Álvarez-Arellano, L. 2014. *Helicobacter pylori* and neurological diseases: married by the laws of inflammation. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 5(4): 400.

- Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F. & Battino, M. 2013. Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current Medicinal Chemistry* 20(5):621-38.
- Alvarez-Suarez, J.M. 2017. Bee products - chemical and biological properties. *Bee Products - Chemical and Biological Properties* 1–306.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S. & Battino, M. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology* 48(8-9):2490-9.
- Alvarez, M.C., Ladeira, M.S.P., Scaletsky, I.C.A., Pedrazzoli, J. & Ribeiro, M.L. 2013. Methylation pattern of THBS1, GATA-4, and HIC1 in pediatric and adult patients infected with *Helicobacter pylori*. *Digestive Diseases and Sciences* 58(10):2850-7.
- Alzahrani, H.A., Alsabehi, R., Boukraâ, L., Abdellah, F., Bellik, Y. & Bakhotmah, B.A. 2012. Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules* 17(9):10540-9.
- Alzahrani, S., Lina, T.T., Gonzalez, J., Pinchuk, I. V., Beswick, E.J. & Reyes, V.E. 2014a. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology* 20(36):12767.
- Alzahrani, S., Lina, T.T., Gonzalez, J., Pinchuk, I. V., Beswick, E.J. & Reyes, V.E. 2014b. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology* 20(36): 12767–12780.
- Amandeep, K., Robin, S., Ramica, S. & Sunil, K. 2012. Peptic ulcer : a review on etiology and pathogenesis. *International Research Journal of Pharmacy* 3(6): 34–38.
- Amaral, T.Y., Padilha, I.G., Presidio, G.A., Silveira, E.A.A.S. da, Duarte, A.W.F., Barbosa, A.P.F., Bezerra, A.F. de S. & Lopez, A.M.Q. 2017. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Apis mellifera* honey on the *Helicobacter pylori* infection of wistar rats gastric mucosa. *Food Science and Technology (Campinas)* 37:34-41.
- Anand David, A., Arulmoli, R. & Parasuraman, S. 2016. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews* 10(20): 84.
- Angrisano, T., Lembo, F., Peluso, S., Keller, S., Chiariotti, L. & Pero, R. 2012. *Helicobacter pylori* regulates iNOS promoter by histone modifications in human gastric epithelial cells. *Medical Microbiology and Immunology* 201(3):249-57.

- Apugo, U.I. & Obia, O. 2020. Modulatory effects of honey on gastric acidity and plasma postprandial bicarbonate in wistar rats. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 10(3): 48–50.
- Arachchi, P.S., Weerasekera, M.M., Senevirathna, B., Weerasekera, D., Fernando, N. & Gunasekara, C.P. 2018. Association of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms with *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients in Sri Lanka. *Microbiology and Immunology* 62(7): 429–435.
- Ariefdjohan, M.W., Martin, B.R., Lachcik, P.J. & Weaver, C.M. 2008. Acute and chronic effects of honey and its carbohydrate constituents on calcium absorption in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(8):2649-54.
- Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. 2006. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(5):1648-56.
- Assegid, G., Erik, S. & Lamprecht, I. 2003. The Antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona spp.* *Journal of Apicultural Science* 47(1):37-49.
- Assis, S., Marques, C.R., Silva, T.M., Costa, R.S., Alcantara-Neves, N.M., Barreto, M.L., Barnes, K.C. & Figueiredo, C.A. 2014. IL10 single nucleotide polymorphisms are related to upregulation of constitutive il-10 production and susceptibility to *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 19(3):168-73.
- Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Tummuru, M.K.R., Blaser, M.J. & Cover, T.L. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *Journal of Biological Chemistry* 270(30):17771-7.
- Ávila, S., Beux, M.R., Ribani, R.H. & Zambiasi, R.C. 2018. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. *Trends in Food Science and Technology*.
- Aziz, M., Jacob, A., Yang, W.-L., Matsuda, A. & Wang, P. 2013. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 93(3):329-42.
- Backert, S., Tegtmeyer, N. & Fischer, W. 2015. Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiology* 10(6):955-65.
- Bäckhed, F., Rokbi, B., Torstensson, E., Zhao, Y., Nilsson, C., Seguin, D., Normark, S., Buchan, A.M.J. & Richter-Dahlfors, A. 2003. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of toll-like receptor 4. *The Journal of Infectious Diseases* 187(5):829-36.

- Bagheri, N., Azadegan-Dehkordi, F., Rahimian, G., Rafieian-Kopaei, M. & Shirzad, H. 2016. Role of regulatory t-cells in different clinical expressions of *Helicobacter pylori* infection 47(4):245-54.
- Bagheri, N., Salimzadeh, L. & Shirzad, H. 2018. The role of T helper 1-cell response in *Helicobacter pylori*-infection. *Microbial Pathogenesis* 123:1-8.
- Bamford, K.B., Fan, X., Crowe, S.E., Leary, J.F., Gourley, W.K., Luthra, G.K., Brooks, E.G., Graham, D.Y., Reyes, V.E. & Ernst, P.B. 1998. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 114(3):482-92.
- Barrera, G., Pizzimenti, S., Daga, M., Dianzani, C., Arcaro, A., Cetrangolo, G.P., Giordano, G., Cucci, M.A., Graf, M. & Gentile, F. 2018. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants* 7(8):102.
- Bashkaran, K., Zunaina, E., Bakiah, S., Sulaiman, S.A., Sirajudeen, K. & Naik, V. 2011. Anti-inflammatory and antioxidant effects of Tualang honey in alkali injury on the eyes of rabbits: experimental animal study. *BMC complementary and alternative medicine* 11(1).
- Beales, I.L.P. 2002. Regulation of gastric function by gastrin releasing peptide. *Gut* 50(6): 897–898.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. & Freeman, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(4):1620-1624.
- Ben-Hamida, A., Man, W.K., McNeil, N. & Spencer, J. 1998. Histamine, xanthine oxidase generated oxygen-derived free radicals and *Helicobacter pylori* in gastroduodenal inflammation and ulceration. *Inflammation Research* 47(4):193-9.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M. & Facino, R.M. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 533(2):185-91.
- Beretta, G., Orioli, M. & Facino, R.M. 2007. Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926). *Planta Medica* 73(11):1182-1189.
- Berstad, A.E., Hogåsen, K., Bukholm, G., Moran, A.P. & Brandtzaeg, P. 2001. Complement activation directly induced by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 120(5):1108-16.

- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M. & Golob, T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry* 105(2):822-8.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S. & Crowe, S.E. 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews* 94(2):329-54.
- Biglari, B., Vd Linden, P.H., Simon, A., Aytac, S., Gerner, H.J. & Moghaddam, A. 2012. Use of Medihoney as a non-surgical therapy for chronic pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord* 50(2):165-169.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5(1):9-19.
- Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Chattopadhyay, I., Varadaraj, A., Ali, E. & Banerjee, R.K. 2003. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry* 278(13): 10993–11001.
- Biswa, R., Sarkar, A. & Khewasubba, S. 2017. Ethnomedicinal uses of honey of stingless bee by Nepali community of Darjeeling foothills of West Bengal, India. *Indian Journal of Traditional Knowledge*.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M.P., Albertini, M.C. & Piatti, E. 2006. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry* 97(2):217-22.
- Blaser, M.J. 1990. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *Journal of Infectious Diseases* 161(4):626-33.
- Boldt, M.S., Pereira, R.D. & Barbosa, A.J.A. 2015. Histological identification of *H. pylori* stained by hematoxylin-eosin and Giemsa: Review for quality control. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 51(2): 108–112.
- Booth, J.S., Salerno-Goncalves, R., Blanchard, T.G., Patil, S.A., Kader, H.A., Safta, A.M., Morningstar, L.M., Czinn, S.J., Greenwald, B.D. & Sztein, M.B. 2015. Mucosal-associated invariant T cells in the human gastric mucosa and blood: Role in *Helicobacter pylori* infection. *Frontiers in Immunology* 6:466.
- Boreiri, M., Samadi, F., Etemadi, A., Babaei, M., Ahmadi, E., Houshang Sharifi, A., Nikmanesh, A., Houshiar, A., Pourfarzi, F., Yazdanbod, A., Alimohammadian, M. & Sotoudeh, M. 2013. Gastric cancer mortality in a high incidence area: Long-term follow-up of *Helicobacter pylori*-related precancerous lesions in the general population. *Archives of Iranian Medicine* 16(6): 343–347.

- Borsato, D.M., Prudente, A.S., Döll-Boscardin, P.M., Borsato, A. V., Luz, C.F.P., Maia, B.H.L.N.S., Cabrini, D.A., Otuki, M.F., Miguel, M.D., Farago, P. V. & Miguel, O.G. 2014. Topical anti-inflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in Southern Brazil. *Journal of Medicinal Food* 17(7):817-825.
- Boussaid, A., Chouaibi, M., Rezig, L., Hellal, R., Donsi, F., Ferrari, G. & Hamdi, S. 2014. Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. *Arabian Journal of Chemistry* 11(2): 265–274.
- Brandes, R.P., Weissmann, N. & Schröder, K. 2014. Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine* 76:208-226.
- Brown, L.F., Berse, B., Jackman, R.W., Tognazzi, K., Manseau, E.J., Senger, D.R. & Dvorak, H.F. 1993. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Research* 53(19):4727-4735.
- Busserolles, J., Gueux, E., Rock, E., Mazur, A. & Rayssiguier, Y. 2002. Substituting honey for refined carbohydrates protects rats from hypertriglyceridemic and prooxidative effects of fructose. *Journal of Nutrition* 132(11):3379-3382.
- Butcher, L.D., den Hartog, G., Ernst, P.B. & Crowe, S.E. 2017. Oxidative stress resulting from *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric carcinogenesis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 3(3): 316–322.
- Calvino-Fernández, M., Benito-Martínez, S. & Parra-Cid, T. 2008. Oxidative stress by *Helicobacter pylori* causes apoptosis through mitochondrial pathway in gastric epithelial cells. *Apoptosis* 13(10): 1267–1280.
- Candiracci, M., Piatti, E., Dominguez-Barragán, M., García-Antrás, D., Morgado, B., Ruano, D., Gutiérrez, J.F., Parrado, J. & Castaño, A. 2012. Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(50):12304-12311.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A. & Pérez-Coello, M.S. 2009. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry* 112(4):1022-30.
- Catchpole, O., Mitchell, K., Bloor, S., Davis, P. & Suddes, A. 2015. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia* 106: 167–174.

- Celli, J.P., Turner, B.S., Afdhal, N.H., Keates, S., Ghiran, I., Kelly, C.P., Ewoldt, R.H., McKinley, G.H., So, P., Erramilli, S. & Bansil, R. 2009. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(34):14321-14326.
- Cerutti, P.A. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227(4685):375-381.
- Cha, M.-S. 2007. Comparative analysis of histochemical stains about detection of gastric mucosa. *Korean J Clin Lab Sci* 39(3):223-30.
- Chan, C.W., Deadman, B.J., Manley-Harris, M., Wilkins, A.L., Alber, D.G. & Harry, E. 2013. Analysis of the flavonoid component of bioactive New Zealand Mānuka (*Leptospermum scoparium*) honey and the isolation, characterisation and synthesis of an unusual pyrrole. *Food Chemistry* 141(3):1772-1781.
- Chang, J.Y., Shim, K.N., Tae, C.H., Lee, K.E., Lee, J., Lee, K.H., Moon, C.M., Kim, S.E., Jung, H.K. & Jung, S.A. 2017. Triple therapy versus sequential therapy for the first-line *Helicobacter pylori* eradication. *BMC Gastroenterology* 17(1):16.
- Chang, L.L., Wang, S.W., Wu, I.C., Yu, F.J., Su, Y.C., Chen, Y.P., Wu, D.C., Kuo, C.H. & Hung, C.H. 2012. Impaired dendritic cell maturation and IL-10 production following *H. pylori* stimulation in gastric cancer patients. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96(1):211-20.
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B. & Sengupta, P.K. 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* 41(1):42-48.
- Chen, L., Mehta, A., Berenbaum, M., Zangerl, A.R. & Engeseth, N.J. 2000. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41(1):42-48.
- Cherdantseva, L.A., Potapova, O. V., Sharkova, T. V., Belyaeva, Y.Y. & Shkurupiy, V.A. 2014. Association of *Helicobacter pylori* and iNOS Production by Macrophages and Lymphocytes in the Gastric Mucosa in Chronic Gastritis. *Journal of Immunology Research* 2014: 10–13.
- Cheung, Y., Meenu, M., Yu, X. & Xu, B. 2019. Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *International Journal of Food Properties* 22(1): 290–308.
- Chey, W.D., Leontiadis, G.I., Howden, C.W. & Moss, S.F. 2017. ACG clinical guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection. *American Journal of Gastroenterology* 112(2): 212–238.

- Chiariotti, L., Angrisano, T., Keller, S., Florio, E., Affinito, O., Pallante, P., Perrino, C., Pero, R. & Lembo, F. 2013. Epigenetic modifications induced by *Helicobacter pylori* infection through a direct microbe-gastric epithelial cells cross-talk. *Medical Microbiology and Immunology* 202(5):327-337.
- Chua, L.S. & Ismail, N.I.M. 2015. Anti-inflammatory and anti-microbial activities of selected honey samples. *Asian Journal of Agricultural Research* 9(6): 293–304.
- Cirak, M.Y., Akyön, Y. & Mégraud, F. 2007. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 12:4-9.
- Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Spano, N. & Sanna, G. 2011. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta* 83(3):924-929.
- Conteduca, V., Sansonno, D., Lauletta, G., Russi, S., Ingravallo, G. & Dammacco, F. 2013. *H. pylori* infection and gastric cancer: State of the art (Review). *International Journal of Oncology* 42(1): 5–18.
- Cook, K.W., Letley, D.P., Ingram, R.J.M., Staples, E., Skjoldmose, H., Atherton, J.C. & Robinson, K. 2014. CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut* 63(10):1550-9.
- Correa P. 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process first american cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Research* 52(24):6735-6740.
- Cosgun, Y., Yildirim, A., Yucel, M., Karakoc, A.E., Koca, G., Gonultas, A., Gursoy, G. & Ustun, H. 2016. Evaluation of Invasive and Noninvasive Methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 17(12): 5265–5272.
- Costa Ferreira da Cruz, B., Ronqui, L., Scharnoski, P., Scharnoski, P., Peruzzolo, M., da Rosa Santos, P., Halak, A., Wielewski, P., Mosconi Magro, J. & Fernanda de Araujo, K. 2019. Health benefits of honey. *Honey Analysis*.
- Cover, T.L. & Blaser, M.J. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry* 267(15):10570-10575.
- Crabtree, J.E. 1996a. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement* 215:3-10.
- Crabtree, J.E. 1996b. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement*.

- Cruz, C.B.N. da, Pieri, F.A., Carvalho-Zilse, G.A., Orlandi, P.P., Nunes-Silva, C.G. & Leomil, L. 2014. Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms. *Acta Amazonica* 44(2):287-90.
- D'Elios, M.M., Manghetti, M., De Carli, M., Costa, F., Baldari, C.T., Burrioni, D., Telford, J.L., Romagnani, S. & Del Prete, G. 1997. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *Journal of immunology* 158(2):962-967.
- da Silva, I.A.A., da Silva, T.M.S., Camara, C.A., Queiroz, N., Magnani, M., de Novais, J.S., Soledade, L.E.B., Lima, E. de O., de Souza, A.L. & de Souza, A.G. 2013. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food chemistry* 141(4):3552-8.
- Dastouri, M.R., Fakhimzadeh, K., Shayeg, J., Dolgari-Sharaf, J., Valilou, M.R. & Maheri-Sis, N. 2008. Evaluating antibacterial activity of the Iranian honey through MIC method on some dermal and intestinal pathogenic bacteria. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7(4): 409–412.
- de Almeida-Muradian, L.B., Stramm, K.M. & Estevinho, L.M. 2014. Efficiency of the FT-IR ATR spectrometry for the prediction of the physicochemical characteristics of *Melipona subnitida* honey and study of the temperature's effect on those properties. *International Journal of Food Science and Technology* 49(1):188-95.
- De Brito, B.B., Da Silva, F.A.F., Soares, A.S., Pereira, V.A., Cordeiro Santos, M.L., Sampaio, M.M., Moreira Neves, P.H. & De Melo, F.F. 2019. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World Journal of Gastroenterology* 25(37):5578.
- De Falco, M., Lucariello, A., Iaquinto, S., Esposito, V., Guerra, G. & De Luca, A. 2015. Molecular mechanisms of *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Journal of Cellular Physiology* 230(8): 1702–1707.
- De Francesco, V., Margiotta, M., Zullo, A., Hassan, C., Della Valle, N., Burattini, O., D'Angelo, R., Stoppino, G., Cea, U., Giorgio, F., Monno, R., Morini, S., Panella, C. & Ierardi, E. 2006. Claritromycin resistance and *Helicobacter pylori* genotypes in Italy. *Journal of Microbiology* 44(6):660.
- De Luca, A., De Falco, M., Iaquinto, S. & Iaquinto, G. 2004. Effects of *Helicobacter pylori* infection on cell cycle progression and the expression of cell cycle regulatory proteins. *Journal of Cellular Physiology* 200(3):334-342.
- Demirel, B.B., Akkas, B.E. & Vural, G.U. 2013. Clinical factors related with *Helicobacter pylori* infection - is there an association with gastric cancer history in first- degree family members? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14:1797-802.

- Deml, L., Aigner, M., Decker, J., Eckhardt, A., Schütz, C., Mittl, P.R.E., Barabas, S., Denk, S., Knoll, G., Lehn, N. & Schneider-Brachert, W. 2005. Characterization of the *Helicobacter pylori* cysteine-rich protein A as a T-helper cell type 1 polarizing agent. *Infection and Immunity* 73(8):4732-42.
- Denic, M., Touati, E. & De Reuse, H. 2020. Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 25(S1): 1–6.
- Devasvaran, K. & Yong, Y.K. 2016. Anti-inflammatory and wound healing properties of Malaysia Tualang honey. *Current Science* 110(1): 47–51.
- Di Tommaso, A., Xiang, Z., Bugnoli, M., Pileri, P., Figura, N., Bayeli, P.F., Rappuoli, R., Abrignani, S. & De Magistris, M.T. 1995. *Helicobacter pylori*-specific CD4+ T-cell clones from peripheral blood and gastric biopsies. *Infection and Immunity* 63(3):1102-1106.
- Ding, S.Z. & Zheng, P.Y. 2012. *Helicobacter pylori* infection induced gastric cancer; Advance in gastric stem cell research and the remaining challenges. *Gut Pathogens* 4(1): 1–11.
- Ding, S.Z., Minohara, Y., Xue, J.F., Wang, J., Reyes, V.E., Patel, J., Dirden-Kramer, B., Boldogh, I., Ernst, P.B. & Crowe, S.E. 2007. *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. *Infection and Immunity* 75(8): 4030–4039.
- Dixon, M.F., Genta, R.M., Yamdley, J.H. & Cornea, P. 1996. Classification grading of gastritis: the updated sydney system. *J Surg Pathol* 20(10):1161-81.
- Drake, I.M., Mapstone, N.P., Schorah, C.J., White, K.L.M., Chalmers, D.M., Dixon, M.F. & Axon, A.T.R. 1998. Reactive oxygen species activity and lipid peroxidation in *Helicobacter pylori* associated gastritis: relation to gastric mucosal ascorbic acid concentrations and effect of *H. pylori* eradication. *Gut* 42(6): 768–771.
- Dunford, C.E. & Hanano, R. 2004. Acceptability to patients of a honey dressing for non-healing venous leg ulcers. *Journal of wound care* 13(5):193-197.
- Dunn, B.E. & Phadnis, S.H. 1998. Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease. *Yale Journal of Biology and Medicine* 71(2):63.
- Eichenseher, J. 2018. Peptic ulcer disease. *Integrative Medicine* Fourth Edi. Elsevier Inc.
- Eicher, A.K., Berns, H.M. & Wells, J.M. 2018. Translating developmental principles to generate human gastric organoids. *CMGH* 5(3):353-363.

- Elseweidy, M.M., Taha, M.M., Younis, N.N., Ibrahim, K.S., Hamouda, H.A., Eldosouky, M.A. & Soliman, H. 2010. Gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection in experimental rats. *Digestive Diseases and Sciences* 55(10): 2770–2777.
- Engevik, A.C., Kaji, I. & Goldenring, J.R. 2020. The physiology of the gastric parietal cell. *Physiological Reviews* 100(2):573-602.
- Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S., Sirajudeen, K.N.S., Salleh, M.S.M. & Gurtu, S. 2010. Antioxidant protection of Malaysian Tualang honey in pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Annales d'Endocrinologie* 71(4):291-296.
- Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S.A., Sirajudeen, K.N.S., Salleh, M.S.M. & Gurtu, S. 2011. Glibenclamide or metformin combined with honey improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of biological sciences* 7(2): 244–252.
- Ernst, P. 1999. Review article: the role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement* 13:13-8.
- Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M. & Domenech, E. 2014. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry* 142:135-143.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.G. & Pereira, E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology* 46(12): 3774–3779.
- Etemadi, A., Safiri, S., Sepanlou, S.G., Ikuta, K., Bisignano, C., Zamanian, M., Zandian, H., Zarghi, A., Zhang, Z.J., Naghavi, M., Malekzadeh, R. & Sajadi, P. 2020. The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2017. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* 5(1):42-54.
- Eteraf-Oskouei, T., Najafi, M. & Gharehbagheri, A. 2013. Natural honey: a new and potent anti-angiogenic agent in the air-pouch model of inflammation. *Drug Research* 64(10): 530–536.
- Eusebi, L.H., Rabitti, S., Artesiani, M.L., Gelli, D., Montagnani, M., Zagari, R.M. & Bazzoli, F. 2017. Proton pump inhibitors: risks of long-term use. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 32(7):1295-1302.
- Fallone, C.A., Chiba, N., van Zanten, S.V., Fischbach, L., Gisbert, J.P., Hunt, R.H., Jones, N.L., Render, C., Leontiadis, G.I., Moayyedi, P. & Marshall, J.K. 2016. The Toronto consensus for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults. *Gastroenterology* 151(1): 51-69.e14.

- Fan, C.-C., Chen, C.-H., Chou, C., Kao, T.-Y., Ning Cheng, A., Yueh-Luen Lee, A., Kuo, C.-L. & Cheng-Liang Kuo, C. 2019. A time-saving-modified Giemsa stain is a better diagnostic method of *Helicobacter pylori* infection compared with the rapid urease test. *J Clin Lab Anal* 34: 23110.
- Fan, X.G., Chua, A., Fan, X.J. & Keeling, P.W.N. 1995. Increased gastric production of interleukin-8 and tumour necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Clinical Pathology* 48(2):133-6.
- Fashner, J. & Gitu, A.C. 2015. Diagnosis and treatment of peptic ulcer disease and *H. pylori* infection. *American Family Physician* 91(4): 236–242.
- Ferrara, N. 2009. Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29(6):789-791.
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M. & Estevinho, L.M. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry* 114(4):1438-43.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O.H., Andersen, P.S. & Girardin, S.E. 2007. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical and Experimental Immunology* 147(2):227-235.
- Figueiredo, C.A., Marques, C.R., Costa, R. dos S., da Silva, H.B.F. & Alcantara-Neves, N.M. 2014. Cytokines, cytokine gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: Friend or foe? *World Journal of Gastroenterology* 20(18): 5235–5243.
- Flach, C.F., Östberg, A.K., Nilsson, A.T., Malefyt, R.D.W. & Raghavan, S. 2011. Proinflammatory cytokine gene expression in the stomach correlates with vaccine-induced protection against *Helicobacter pylori* infection in mice: an important role for interleukin-17 during the effector phase. *Infection and Immunity* 79(2): 879–886.
- Flores, M.S.R., Escuredo, O. & Carmen Seijo, M. 2015. Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrenaica* honeydew honeys. *Food Chemistry* 166:101-106.
- Folkman, J. 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in oncology* 16 (Vol. 29, No. 6, pp. 15-18).
- Food and Drug Administration. 2005. Guidance for industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. *US Department of Health and Human Services*.
- Forte, J.G. & Zhu, L. 2009. Apical recycling of the gastric parietal cell H⁺-K⁺-ATPase. *Annual Review of Physiology* 72:273-96.
- Fowler, H.G. 1979. Responses by a stingless bee to a subtropical environment. *revista de biologia tropical* 27(1): 111–118.

- Freedberg, D.E., Kim, L.S. & Yang, Y.X. 2017. The Risks and Benefits of Long-term Use of Proton Pump Inhibitors: Expert Review and Best Practice Advice From the American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* 152(4): 706–715.
- Fridovich, I. 2013. Superoxide dismutase. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*.
- Fu, S., Ramanujam, K.S., Wong, A., Fantry, G.T., Drachenberg, C.B., James, S.P., Meltzer, S.J. & Wilson, K.T. 1999. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* 116(6): 1319–1329.
- Fujimoto, Y., Shimoyama, A., Suda, Y. & Fukase, K. 2012. Synthesis and immunomodulatory activities of *Helicobacter pylori* lipophilic terminus of lipopolysaccharide including lipid A. *Carbohydrate Research* 356:37-43.
- Gasparri, M., Afrin, S., Forbes-Hernández, T.Y., Cianciosi, D., Reboledo-Rodriguez, P., Amici, A., Battino, M. & Giampieri, F. 2018. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. *Food and Chemical Toxicology* 120: 578–587.
- Gentile, F., Arcaro, A., Pizzimenti, S., Daga, M., Paolo Cetrangolo, G., Dianzani, C., Lepore, A., Graf, M., R. J. Ames, P. & Barrera, G. 2017. DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. *AIMS Genetics* 4(2):103.
- Ghazali FC. 2009. Morphological characterization study of Malaysian honey- a VPSEM, EDX randomised attempt. *Annal Microscop* 9: 93–102.
- Giamarellos-Bourboulis, E.J., Tzivras, M., Kourtesas, D., Arnaoutis, T.P., Delladatsima, I., Dionyssiou-Asteriou, A., Davaris, P., Vafiadis-Zouboulis, I. & Archimandritis, A. 2003. Lipid peroxidation in chronic gastritis; any influence of *Helicobacter pylori*? *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68(4): 257–261.
- Gisbert, J.P. & Calvet, X. 2011. Review article: The effectiveness of standard triple therapy for *Helicobacter pylori* has not changed over the last decade, but it is not good enough. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 34(11-12):1255-1268.
- Gobert, A.P. & Wilson, K.T. 2017. Polyamine- and NADPH-dependent generation of ROS during *Helicobacter pylori* infection: a blessing in disguise. *Free Radical Biology and Medicine* 105:16-27.
- Gobert, A.P., McGee, D.J., Akhtar, M., Mendz, G.L., Newton, J.C., Cheng, Y., Mobley, H.L.T. & Wilson, K.T. 2001. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(24): 13844–13849.

- Goel, H.L. & Mercurio, A.M. 2013. VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer* 13(12):871-882.
- Goh, K.-L., Cheah, P.-L., Md, N., Quek, K.-F. & Parasakthi, N. 2007. Ethnicity and *H. pylori* as risk factors for gastric cancer in Malaysia: a prospective case control study. *The American Journal of Gastroenterology* 102(1): 40–45.
- Gonzalez-Valencia, G., Perez-Perez, G.I., Washburn, R.G. & Blaser, M.J. 1996. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the bactericidal activity of human serum. *Helicobacter* 1(1):28-33.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A. & Marshall, B.J. 1986. *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *Journal of Clinical Pathology* 39(4):353-365.
- Gopalakrishnan, B., Nash, K.M., Velayutham, M. & Villamena, F.A. 2012. Detection of nitric oxide and superoxide radical anion by electron paramagnetic resonance spectroscopy from cells using spin traps. *Journal of Visualized Experiments* (66):e2810.
- Goud, K.A. 2017. Prevalence, risk factors of chronic peptic ulcer disease in Khammam, Telangana State. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences* 5: 600–603.
- Graham, D.R., Dixon, R.E., Hughes, J.M. & Thornsberry, C. 1985. Disk diffusion antimicrobial susceptibility testing for clinical and epidemiologic purposes. *AJIC: American Journal of Infection Control* 13(6):241-249.
- Graham, D.Y. & Fischbach, L. 2010. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*.
- Graham, D.Y., Lee, Y.C. & Wu, M.S. 2014. Rational *Helicobacter pylori* therapy: evidence-based medicine rather than medicine-based evidence. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12(2):177-e13.
- Grasberger, H., El-Zaatari, M., Dang, D.T. & Merchant, J.L. 2013. Dual oxidases control release of hydrogen peroxide by the gastric epithelium to prevent *Helicobacter felis* infection and inflammation in mice. *Gastroenterology* 145(5):1045-1054.
- Gray, S.F., Wyatt, J.I. & Rathbone, B.J. 1986. Simplified techniques for identifying *Campylobacter Pyloridis*. *Journal of Clinical Pathology* 39(11): 1279.
- Griffiths, K., Aggarwal, B., Singh, R., Buttar, H., Wilson, D. & De Meester, F. 2016. Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Diseases* 4(4): 28.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., De Vries, J.E. & Roncarolo, M.G. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652):737-742.

- Gschwantler, M. & Dragosics, B. 2000. Physiopathology of *Helicobacter pylori* infections. *Acta medica Austriaca* 27(4):117-121.
- Guerrini, A., Bruni, R., Maietti, S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Scalvenzi, L. & Sacchetti, G. 2009. Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chemistry* 114(4):1413-20.
- Gupta, S., Singh, O., Bhagel, P., Moses, S., Shukla, S. & Mathur, R. 2011. Honey dressing versus silver sulfadiazene dressing for wound healing in burn patients: a retrospective study. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 4(3):183.
- Gyires, K., Nemeth, J. & S. Zadori, Z. 2012. Gastric mucosal protection and central nervous system. *Current Pharmaceutical Design* 19(1):34-39.
- Gyurkovska, V., Alipieva, K., Maciuk, A., Dimitrova, P., Ivanovska, N., Haas, C., Bley, T. & Georgiev, M. 2011. Anti-inflammatory activity of Devil's claw in vitro systems and their active constituents. *Food Chemistry* 125(1):171-8.
- Habib, H.M., Al Meqbali, F.T., Kamal, H., Souka, U.D. & Ibrahim, W.H. 2014. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chemistry* 153:28-34.
- Hagag, A.A., Amin, S.M., EL-Fiky, R.B. & El-Sayad, M.E. 2018. Study of serum levels of some oxidative stress markers in children with *Helicobacter pylori* infection. *Infectious Disorders - Drug Targets* 18(1):52-59.
- Hagag, A.A., Amin, S.M., Emara, M.H. & Abo-Resha, S.E. 2018. Gastric mucosal oxidative stress markers in children with *Helicobacter pylori* infection. *Infectious Disorders - Drug Targets* 18(1): 60–67.
- Hajjani, E. 2009. Treatment for *Helicobacter pylori* infection, an overview. *Jundishapur Journal of Microbiology*.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M. & Moilanen, E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*.
- Handa, O., Naito, Y. & Yoshikawa, T. 2010. *Helicobacter pylori*: a ROS-inducing bacterial species in the stomach. *Inflammation Research* 59(12): 997–1003.
- Havsteen, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96(2-3):67-202.

- Henriques, A., Jackson, S., Cooper, R. & Burton, N. 2006. Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(4):773-777.
- Hicklin, D.J. & Ellis, L.M. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology* 23(5):1011-1027.
- Hida, N., Shimoyama, T., Neville, P., Dixon, M.F., Axon, A.T.R., Shimoyama, T. & Crabtree, J.E. 1999. Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial cag status and peptic ulceration. *Journal of Clinical Pathology* 52(9):658-664.
- Higuchi, K., Joh, T., Nakada, K. & Haruma, K. 2012. Mo1081 Is Proton Pump Inhibitor (PPI) Therapy for Reflux Esophagitis (RE) Sufficient? a Multicenter Retrospective Real-World Survey of Japanese Re Patients Treated With PPIs. *Gastroenterology*.
- Himaya, S.W.A., Ryu, B., Qian, Z.J., Li, Y. & Kim, S.K. 2011. 1-(5-bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone [SE1] suppresses pro-inflammatory responses by blocking NF- κ B and MAPK signaling pathways in activated microglia. *European Journal of Pharmacology* 670(2-3):608-616.
- Holokai, L., Chakrabarti, J., Broda, T., Chang, J., Hawkins, J.A., Sundaram, N., Wroblewski, L.E., Peek, R.M., Wang, J., Helmrath, M., Wells, J.M. & Zavros, Y. 2019. Increased programmed death-ligand 1 is an early epithelial cell response to *Helicobacter pylori* infection. *PLoS Pathogens* 15(1):e1007468.
- Holzer, P. 2007. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Current Opinion in Pharmacology* 7(6):563-569.
- Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D.Y., Wong, V.W.S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G. & Ng, S.C. 2017. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 153(2): 420–429.
- HR Bukhari dan Muslim. (t.th.). *Book 71 (7). Sahih Bukhari*.
- Huskić, J., Zaciragić, A., Babić, N. & Mulabegović, N. 2006. Nitric oxide in serum and renal tissue during compensatory renal hypertrophy in rats. *Bosnian journal of basic medical sciences / Udruzenje basicnih medicinskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences* 6(1):46.
- Hussein, S.Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S. & Mohd Yusof, Y.A. 2012. Gelam honey inhibits the production of proinflammatory mediators NO, PGE 2, TNF- α , and IL-6 in carrageenan-induced acute paw edema in rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012.

- Hussein, S.Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S. & Mohd Yusof, Y.A. 2013. Gelam honey attenuates carrageenan-induced rat paw inflammation via nf-kb pathway. *PLoS ONE* 8(8).
- Hussein, S.Z., Yusoff, K.M., Makpol, S. & Yusof, Y.A.M. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents increase with gamma irradiation in two types of malaysian honey. *Molecules* 16(9): 6378–6395.
- Iaquinto, G., Todisco, A., Giardullo, N., D’Onofrio, V., Pasquale, L., De Luca, A., Andriulli, A., Perri, F., Rega, C., De Chiara, G., Landi, M., Taccone, W., Leandro, G. & Figura, N. 2000. Antibody response to *Helicobacter pylori* cagA and heat-shock proteins in determining the risk of gastric cancer development. *Digestive and Liver Disease* 32(5):378-383.
- Ibrahim Khalil, M.D., Sulaiman, S.A., Alam, N., Ramli, N., Mohamed, M., Bai’E, S. & Hua, G.S. 2012. Content and antioxidant properties of processed Tualang honey (AgroMas®) collected from different regions in Malaysia. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(SUPPL.3): 214–219.
- Inoue, K., Murayama, S., Seshimo, F., Takeba, K., Yoshimura, Y. & Nakazawa, H. 2005. Identification of phenolic compound in Manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(5):872-8.
- Israel, D.A. & Peek, R.M. 2001. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 15(9):1271-1290.
- Janulaityte-Gunther, D., Kucinskiene, R., Kupcinskis, L., Pavilonis, A., Labanauskas, L., Cizauskas, A., Schmidt, U., Wadström, T. & Andersen, L.P. 2005. The humoral immune response to *Helicobacter pylori* infection in children with gastrointestinal symptoms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 44(2): 205–212.
- Jianyuan Chai. 2011. Peptic ulcer disease. *Intech open*. Rijeka, Croatia.
- Jung, H.K., Lee, K.E., Chu, S.H. & Yi, S.Y. 2001. Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 16(12):1336-1340.
- Juszczak, L., Gałkowska, D., Ostrowska, M. & Socha, R. 2016. Antioxidant activity of honey supplemented with bee products. *Natural Product Research* 30(12): 1436–1439.

- Kaebisch, R., Mejías-Luque, R., Prinz, C. & Gerhard, M. 2014. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene a impairs human dendritic cell maturation and function through Il-10-mediated activation of STAT3. *The Journal of Immunology* 192(1):316-323.
- Kang, M.J., Song, E.J., Kim, B.Y., Kim, D.J. & Park, J.H. 2014. *Helicobacter pylori* induces vascular endothelial growth factor production in gastric epithelial cells through hypoxia-inducible factor-1 α -dependent pathway. *Helicobacter* 19(6):476-483.
- Kao, C.Y., Sheu, B.S. & Wu, J.J. 2016. *Helicobacter pylori* infection: an overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal* 39(1):14-23.
- Karam, S.M. & Forte, J.G. 1994. Inhibiting gastric H⁺-K⁺-ATPase activity by omeprazole promotes degeneration and production of parietal cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*.
- Karttunen, R., Karttunen, T., Ekre, H.P.T. & MacDonald, T.T. 1995. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut* 36(3): 341–345.
- Kassim, M., Achoui, M., Mansor, M. & Yusoff, K.M. 2010. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. *Fitoterapia* 81(8):1196-1201.
- Kassim, M., Achoui, M., Mustafa, M.R., Mohd, M.A. & Yusoff, K.M. 2010. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. *Nutrition Research* 30(9):650-659.
- Kaushik, A., Dwivedi, A., Sharma, G., Avinash, K., Abha, D., Ganesh, S., Kaushik, A., Dwivedi, A. & Sharma, G. 2011. Peptic ulcer: a review with emphasis on plants from *Cucurbitaceae* family with antiulcer potential. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy* 2(6): 1714–1716.
- Kawahara, T., Kohjima, M., Kuwano, Y., Mino, H., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Tsunawaki, S., Wada, A., Sumimoto, H. & Rokutan, K. 2005. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer NOXO1 in guinea pig gastric mucosal cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 288(2):C450-C457.
- Keenan, J., Day, T., Neal, S., Cook, B., Perez-Perez, G., Allardyce, R. & Bagshaw, P. 2000. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiology Letters* 182(2): 259–264.
- Kek, S.P., Chin, N.L., Yusof, Y.A., Tan, S.W. & Chua, L.S. 2014. Total phenolic contents and colour intensity of Malaysian honeys from the *Apis spp.* and *Trigona spp.* bees. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2(December 2014): 150–155.

- Keng, C.B., Haron, H., Talib, R.A. & Subramaniam, P. 2017. Physical properties, antioxidant content and anti-oxidative activities of Malaysian stingless Kelulut (*Trigona spp.*) honey. *Journal of Agricultural Science* 9(13): 32.
- Khalil, M.I., Mahaneem, M., Jamalullail, S.M.S., Alam, N. & Sulaiman, S.A. 2011. Evaluation of radical scavenging activity and colour intensity of nine Malaysian honeys of different origin. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 3(1):04-11.
- Khanzode, S.S., Khanzode, S.D. & Dakhale, G.N. 2003. Serum and plasma concentration of oxidant and antioxidants in patients of *Helicobacter pylori* gastritis and its correlation with gastric cancer. *Cancer Letters* 195(1):27-31.
- Kidd, M., Miu, K., Tang, L.H., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J., Sandor, A. & Modlin, I.M. 1997. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates histamine release and DNA synthesis in rat enterochromaffin-like cells. *Gastroenterology* 113(4):1110-1117.
- Kim, H. 2005. Oxidative stress in *Helicobacter pylori*-induced gastric cell injury. *Inflammopharmacology* 13(1-3): 63-74.
- Kim, J., Cho, Y.A., Choi, I.J., Lee, Y.S., Kim, S.Y., Shin, A., Cho, S.J., Kook, M.C., Nam, J.H., Ryu, K.W., Lee, J.H. & Kim, Y.W. 2012. Effects of interleukin-10 polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection, and smoking on the risk of noncardia gastric cancer. *PLoS ONE* 7(1):e29643.
- Kim, N., Marcus, E.A., Wen, Y., Weeks, D.L., Scott, D.R., Jung, H.C., Song, I.S. & Sachs, G. 2004. Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infection and Immunity* 72(4):2358-68.
- Kim, S.E., Park, M.I., Park, S.J., Moon, W., Choi, Y.J., Cheon, J.H., Kwon, H.J., Ku, K.H., Yoo, C.H., Kim, J.H., Lee, G.W. & Song, S.E. 2015. Trends in *Helicobacter pylori* eradication rates by first-line triple therapy and related factors in eradication therapy. *Korean Journal of Internal Medicine* 30(6):801.
- Kim, S.G., Han, S.M., Jang, H.R., Hong, I.P., Woo, S.O. & Kim, S.H. 2015. Composition and anti-*Helicobacter pylori* activity of the different floral honeys from Korea. *Journal of Apiculture* 30(3): 217.
- Kim, S.G., Hong, I.P., Woo, S.O., Jang, H.R., Pak, S.C. & Han, S.M. 2017. Isolation of abscisic acid from Korean acacia honey with anti-*Helicobacter pylori* activity. *Pharmacognosy Magazine* 13(50): S170-S173.
- Kim, T.H. & Shivdasani, R.A. 2016. Stomach development, stem cells and disease. *Development (Cambridge)* 143(4):554-565.
- Kim, Y.J., Kim, E.H. & Hahm, K.B. 2012. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*.

- Kinoshita, Y., Ishimura, N. & Ishihara, S. 2018. Advantages and disadvantages of long-term proton pump inhibitor use. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*.
- Kishore, R.K., Halim, A.S., Syazana, M.S.N. & Sirajudeen, K.N.S. 2011. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. *Nutrition Research* 31(4): 322–325.
- Klatt, E. C., Robbins, S. L., & Cotran, R. S. 2006. *Robbins and Cotran atlas of pathology*. Chronic Peptic Ulcer. 4th Ed., Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
- Koelzer, J., Pereira, D.A., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G. & Fröde, T.S. 2009. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry*.
- Kohler, J.E., Blass, A.L., Liu, J., Tai, K. & Soybel, D.I. 2010. Antioxidant pretreatment prevents omeprazole-induced toxicity in an in vitro model of infectious gastritis. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Koochak, H., Seyyednejad, S.M. & Motamedi, H. 2010. Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(3): 180–184.
- Kotas, M.E. & Medzhitov, R. 2015. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoglu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C. & Candan, F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry* 100(2): 526–534.
- Kuipers, E.J., Thijs, J.C. & Festen, H.P. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 9 Suppl 2: 59–69.
- Kuipers, E.J., Lundell, L., Klinkenberg-Knol, E.C., Havu, N., Festen, H.P.M., Liedman, B., Lamers, C.B.H.W., Jansen, J.B.M.J., Dalenbäck, J., Snel, P., Nelis, G.F. & Meuwissen, S.G.M. 1996. Atrophic Gastritis and *Helicobacter pylori* Infection in Patients with Reflux Esophagitis Treated with Omeprazole or Fundoplication. *New England Journal of Medicine*.
- Kwakman, P.H.S., Velde, A.A. te, Boer, L., Speijer, D., Christina Vandenbroucke-Grauls, M.J. & Zaat, S.A.J. 2010. How honey kills bacteria. *The FASEB Journal* 24(7):2576–82.
- Kwiecien, S., Jasnos, K., Magierowski, M., Sliwowski, Z., Pajdo, R., Brzozowski, B., Mach, T., Wojcik, D. & Brzozowski, T. 2014. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. *Journal of Physiology and Pharmacology*.

- Lachman, J., Kolihová, D., Míhlová, D., Košata, J., Titěra, D. & Kult, K. 2007. Analysis of minority honey components: possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chemistry*.
- Lagier, J.C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M. & Raoult, D. 2015. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Lambeth, J.D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*.
- Lanas, A., & Chan, F. 2017. Peptic ulcer disease. *Lancet* (London, England), 390 (10094): 613–624.
- Lawrence, T. 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.
- Lebda, M.A., El-Far, A.H., Noreldin, A.E., Elewa, Y.H.A., Al Jaouni, S.K. & Mousa, S.A. 2018. Protective effects of miswak (*salvadora persica*) against experimentally induced gastric ulcers in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Lee, J.Y. & Kim, N. 2015. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: Histology. *Annals of Translational Medicine* 3(1): 1–8.
- Lehmann, F.S., Terracciano, L., Carena, I., Baeriswyl, C., Drewe, J., Tornillo, L., De Libero, G. & Beglinger, C. 2002. In situ correlation of cytokine secretion and apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*.
- Leong, A.G., Herst, P.M. & Harper, J.L. 2012. Indigenous New Zealand honeys exhibit multiple anti-inflammatory activities. *Innate Immunity* 18(3): 459–466.
- Li, B.Z., Threapleton, D.E., Wang, J.Y., Xu, J.M., Yuan, J.Q., Zhang, C., Li, P., Ye, Q.L., Guo, B., Mao, C. & Ye, D.Q. 2015. Comparative effectiveness and tolerance of treatments for *Helicobacter pylori*: systematic review and network meta-analysis. *BMJ*.
- Li, T., Jin, X., Dong, J. & Deng, H. 2017. Effect of risk factors on expression of vascular endothelial growth factor in precancerous lesions of gastric cancer. *Biomedical Research (India)* 28(21): 9438–9441.
- Li, X.Q., Andersson, T.B., Ahlström, M. & Weidolf, L. 2004. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug Metabolism and Disposition*.
- Liang, T.Y., Deng, R.M., Li, X., Xu, X. & Chen, G. 2021. The role of nitric oxide in peptic ulcer: A narrative review. *Medical Gas Research* 11(1): 42–45.

- Lillehoj, E.P., Guang, W., Ding, H., Czinn, S.J. & Blanchard, T.G. 2012. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation: Role of MUC1 mucin. *Journal of Pediatric Biochemistry*.
- Lim, J.W., Kim, H. & Kim, K.H. 2001. NF- κ B, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Liu, N., Wu, Q., Wang, Y., Sui, H., Liu, X., Zhou, N., Zhou, L., Wang, Y., Ye, N., Fu, X., Yu, N.A. & Li, Q. 2014. *Helicobacter pylori* promotes VEGF expression via the p38 MAPK-mediated COX-2-PGE2 pathway in MKN45 cells. *Molecular Medicine Reports* 10(4): 2123–2129.
- Llorente, C., Jepsen, P., Inamine, T., Wang, L., Bluemel, S., Wang, H.J., Loomba, R., Bajaj, J.S., Schubert, M.L., Sikaroodi, M., Gillevet, P.M., Xu, J., Kisseleva, T., Ho, S.B., Depew, J., Du, X., Sørensen, H.T., Vilstrup, H., Nelson, K.E., Brenner, D.A., Fouts, D.E. & Schnabl, B. 2017. Gastric acid suppression promotes alcoholic liver disease by inducing overgrowth of intestinal *Enterococcus*. *Nature Communications*.
- Lopes, A.I., Quiding-Jarbrink, M., Palha, A., Ruivo, J., Monteiro, L., Oleastro, M., Santos, A. & Fernandes, A. 2005. Cytokine expression in pediatric *Helicobacter pylori* infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*.
- Lordan, R., Tsoupras, A. & Zabetakis, I. 2019. Inflammation. *The Impact of Nutrition and Statins on Cardiovascular Diseases*.
- Lu, J., Kasama, T., Kobayashi, K., Yoda, Y., Shiozawa, F., Hanyuda, M., Negishi, M., Ide, H. & Adachi, M. 2000. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *The Journal of Immunology*.
- Lundgren, A., Strömberg, E., Sjöling, Å., Lindholm, C., Enarsson, K., Edebo, A., Johnsson, E., Suri-Payer, E., Larsson, P., Rudin, A., Svennerholm, A.M. & Lundin, B.S. 2005. Mucosal FOXP3-expressing CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infection and Immunity*.
- Lundgren, A., Suri-Payer, E., Enarsson, K., Svennerholm, A.M. & Lundin, B.S. 2003. *Helicobacter pylori*-specific CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infection and Immunity*.
- Lusby, P.E., Coombes, A. & Wilkinson, J.M. 2002. Honey: a potent agent for wound healing? *Journal of wound, ostomy, and continence nursing : official publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society*.
- Lusby, P.E., Coombes, A.L. & Wilkinson, J.M. 2005. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Res* 36(5): 464–467.
- Luzina, I.G., Keegan, A.D., Heller, N.M., Rook, G.A.W., Shea-Donohue, T. & Atamas, S.P. 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *Journal of Leukocyte Biology*.

- Ma, Y., Zhang, L., Rong, S., Qu, H., Zhang, Y., Chang, D., Pan, H. & Wang, W. 2013. Relation between gastric cancer and protein oxidation, DNA damage, and lipid peroxidation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Majtan, J. 2014. Honey: An immunomodulator in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*.
- Malekzadeh, R., Mohamadnejad, M., Siavoshi, F. & Massarrat, S. 2004. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in Iran: Low efficacy of recommended western regimens. *Archives of Iranian Medicine*.
- Malfertheiner, P., Mégraud, F., O'Morain, C., Hungin, P.S., Jones, R., Axon, A., Graham, D.Y. & Tytgat, G. 2002. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16(2): 167–80.
- Malik, T. F., Gnanapandithan, K., & Singh, K. 2021. Peptic Ulcer Disease. *In StatPearls*.
- Malnick, S.D., Melzer, E., Attali, M., Duek, G. & Yahav, J. 2014. *Helicobacter pylori*: friend or foe? *World J Gastroenterol* 20(27): 8979–8985.
- Mandal, M. & Jaganathan, S.K. 2009. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Mandal, M.D. & Mandal, S. 2011. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1(2): 154–160.
- Mandal, S., DebMandal, M., Pal, N.K. & Saha, K. 2010. Synergistic anti-*Staphylococcus aureus* activity of Amoxicillin in combination with *Emblica officinalis* and *Nymphae odorata* extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.
- Manente, L., Perna, A., Buommino, E., Altucci, L., Lucariello, A., Citro, G., Baldi, A., Iaquinto, G., Tufano, M.A. & De Luca, A. 2008. The *Helicobacter pylori*'s protein *vacA* has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*.
- Mannina, L., Sobolev, A.P., Di Lorenzo, A., Vista, S., Tenore, G.C. & Daglia, M. 2015. chemical composition of different botanical origin honeys produced by Sicilian Black Honeybees (*Apis mellifera ssp. sicula*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(25): 5864–5874.
- Manyi-Loh, Christy E., Clarke, A.M., Munzhelele, T., Green, E., Mkwetshana, N.F. & Ndip, R.N. 2010. Selected south African honeys and their extracts possess in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity. *Archives of Medical Research* 41(5): 324–331.

- Manyi-Loh, Christy Echakachi, Clarke, A.M., Green, E. & Ndip, R.N. 2013. Inhibitory and bactericidal activity of selected South African honeys and their solvent extracts against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 26(5): 897–906.
- Marcus, E.A., Inatomi, N., Nagami, G.T., Sachs, G. & Scott, D.R. 2012. The effects of varying acidity on *Helicobacter pylori* growth and the bactericidal efficacy of Ampicillin. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*.
- Marnett, L.J. 1999. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.
- Marshall, B.J. & Warren, J.R. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patient with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 8390: 1311–1314.
- Martinsen, T.C., Bergh, K. & Waldum, H.L. 2005. Gastric juice: A barrier against infectious diseases. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. & Nacoulma, O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*.
- Medeiros, V. de F.L.P., Azevedo, Í.M., Rêgo, A.C.M., do Egito, E.S.T., Araújo-Filho, I. & Medeiros, A.C. 2016. Antibacterial properties and healing effects of *Melipona scutellaris* honey in MRSA-infected wounds of rats. *Acta Cirurgica Brasileira*.
- Mégraud, F., Bessède, E. & Varon, C. 2015. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clinical Microbiology and Infection* 21(11): 984–990.
- Mejías-Luque, R. & Gerhard, M. 2017. Immune evasion strategies and persistence of *Helicobacter pylori*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*.
- Melton, S.D., Genta, R.M. & Souza, R.F. 2010. Biomarkers and molecular diagnosis of gastrointestinal and pancreatic neoplasms. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*.
- Minden-Birkenmaier, B.A., Meadows, M.B., Cherukuri, K., Smeltzer, M.P., Smith, R.A., Radic, M.Z. & Bowlin, G.L. 2020. Manuka honey modulates the release profile of a dHL-60 neutrophil model under anti-inflammatory stimulation: Manuka honey modulates anti-inflammatory dHL-60 cytokine output. *Journal of Tissue Viability* 29(2): 91–99.
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P. & Malik, A.B. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants and Redox Signaling*.
- Miyazawa, T., Shibata, A., Sookwong, P., Kawakami, Y., Eitsuka, T., Asai, A., Oikawa, S. & Nakagawa, K. 2009. Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol). *Journal of Nutritional Biochemistry*.

- Miyazawa, T., Tsuzuki, T., Nakagawa, K. & Igarashi, M. 2004. Antiangiogenic potency of vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Mohamed, M., Sirajudeen, K.N.S., Swamy, M., Yaacob, N.S. & Sulaiman, S.A. 2010. Studies on the antioxidant properties of Tualang honey of Malaysia. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*.
- Mohamed, M., Sulaiman, S.A., Jaafar, H. & Salam, K.N. 2011. Antioxidant protective effect of honey in cigarette smoke-induced testicular damage in rats. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Mohamed, Z.B.H. & Hamad Alfarisi, H.A. 2017. Tualang honey: composition, physiochemical properties and clinical importance. *International Research Journal of Pharmacy* 8(9): 1–5.
- Mohd-Aspar, M.A.S., Edros, R.Z. & Hamzah, N.A. 2019. Antibacterial properties of Kelulut, Tualang and Acacia honey against wound-infecting bacteria. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 42(4): 1185–1208.
- Molan, P. 2009. Honey: antimicrobial actions and role in disease management. *New Strategies Combating Bacterial Infection*.
- Molan, P.C. 2001. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *American Journal of Clinical Dermatology* 2(1): 13–19.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X. & Estevinho, L.M. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*.
- Moskaug, J.O., Carlsen, H., Myhrstad, M.C.W. & Blomhoff, R. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *The American journal of clinical nutrition*.
- Munshi, R. 2014. Exploration of the angiogenic potential of honey. *British Journal of Pharmaceutical Research* 4(4): 477–489.
- Nagaya, H., Inatomi, N., Nohara, A. & Satoh, H. 1991. Effects of the enantiomers of lansoprazole (AG-1749) on H^+K^+ -ATPase activity in canine gastric microsomes and acid formation in isolated canine parietal cells. *Biochemical Pharmacology*.
- Nair, A., Morsy, M.A. & Jacob, S. 2018. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development. *Drug Development Research*.
- Naito, Y. & Yoshikawa, T. 2002. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 33(3): 323–336.

- Naito, Y., Yoshikawa, T., Ando, T., Kishi, A., Ueda, S., Oyamada, H. & Kondo, M. 1992. Changes in superoxide dismutase activity in the gastric mucosa of peptic ulcer patients. *Journal of Clinical Gastroenterology*.
- Nasir, N.A.M., Halim, A.S., Singh, K.K.B., Dorai, A.A. & Haneef, M.N.M. 2010. Antibacterial properties of Tualang honey and its effect in burn wound management: a comparative study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.
- Nasuti, C., Gabbianelli, R., Falcioni, G. & Cantalamessa, F. 2006. Antioxidative and gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. *Nutrition Research* 26(3): 130–137.
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature*.
- Nathan, C. & Shiloh, M.U. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Ndip, R.N., Malange Takang, A.E., Ojongokpoko, J.E.A., Luma, H.N., Malongue, A., Akoachere, J.F.T.K., Ndip, L.M., MacMillan, M. & Weaver, L.T. 2008. *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastro-duodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram. *Tropical Medicine and International Health* 13(6): 848–854.
- Ndip, R.N., Takang, A.E.M., Echakachi, C.M., Malongue, A., Akoachere, J.-F.T.K., Ndip, L.M. & Luma, H.N. 2007. *In-vitro* antimicrobial activity of selected honeys on clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *African Health Sciences* 7(74): 228–231.
- Ngoi, V., Ibrahim, N., Mohd Niza, N.F.S., Mohd Rodi, M.M., Zakaria, A.J., Ismail, Z. & Mohd, K.S. 2016. Effect of processing treatment on antioxidant, phytochemical and enzymatic properties of honey (*Trigona spp*). *Malaysian Journal of Analytical Science* 20(September): 413–422.
- Niv, Y. & Rokkas, T. 2015. Recent advances in *Helicobacter pylori* eradication. *Annals of Gastroenterology*.
- Noach, L.A., Bosma, N.B., Jansen, J., Hoek, F.J., Van Deventer, S.J.H. & Tytgat, G.N.J. 1994. Mucosal tumor necrosis factor- α , interleukin-1/3, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.
- Nordin, A., Sainik, N.Q.A.V., Zulfarina, M.S., Naina-Mohamed, I., Saim, A. & Bt Hj Idrus, R. 2017. Honey and epithelial to mesenchymal transition in wound healing: an evidence-based review. *Wound Medicine* 18: 8–20.

- Nweze, J., V. Olovo, C., Innocent Nweze, E., Okechukwu John, O. & Paul, C. 2019. Therapeutic properties of honey. *Honey Analysis - New Advances and Challenges* 1–21.
- Nzeako, B.C. & Al-namaani, F. 2006. The Antibacterial activity of honey on *Helicobacter pylori* 6(2).
- O' Toole, P.W., Lane, M.C. & Porwollik, S. 2000. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes and Infection*.
- O'Connor, A., Fischbach, W., Gisbert, J.P. & O'Morain, C. 2016. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2016. *Helicobacter*.
- O'Morain, N.R., Dore, M.P., O'Connor, A.J.P., Gisbert, J.P. & O'Morain, C.A. 2018. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in 2018. *Helicobacter* 23: 1–9.
- O'Toole, D., Abdel-Latif, M.M.M., Long, A., Windle, H.J., Murphy, A.M., Bowie, A., O'Neill, L.A.J., Weir, D.G. & Kelleher, D. 2005. Low pH and *Helicobacter pylori* increase nuclear factor kappa B binding in gastric epithelial cells: a common pathway for epithelial cell injury? *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Obst, B., Wagner, S., Sewing, K.F. & Beil, W. 2000. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis*.
- Odenbreit, S., Gebert, B., Püls, J., Fischer, W. & Haas, R. 2001. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of cagA. *Cellular Microbiology*.
- Oertel, E. 1980. Beekeeping in the United States: honey composition and properties. *Farmers weekly*.
- Ohnishi, S., Ma, N., Thanan, R., Pinlaor, S., Hammam, O., Murata, M. & Kawanishi, S. 2013. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Okamoto, N., Nambu, T., Matsuda, Y., Matsuo, K., Osaki, K., Kanai, Y., Ogawa, Y., Yonemitsu, S., Kita, R., Muro, S., Sugawara, A. & Oki, S. 2012. Distal renal tubular acidosis that became exacerbated by proton pump inhibitor use. *Internal Medicine*.
- Omar, M.S., Damanhuri, N.S. & Kumolosasi, E. 2017. Influences of proton pump inhibitor on *Helicobacter pylori* adherence to the gastrointestinal cell lines. *Turkish Journal of Gastroenterology* 28(1): 53–59.
- Orsini, B., Ciano, G., Censini, S., Surrenti, E., Pellegrini, G., Milani, S., Amorosi, A. & Surrenti, C. 2000. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island is associated with enhanced interleukin-8 expression in human gastric mucosa. *Digestive and Liver Disease*.

- Owen D. A. (1986). Normal histology of the stomach. *The American journal of surgical pathology*, 10(1), 48–61.
- Owoyele, B.V., Adenekan, O.T. & Soladoye, A.O. 2011. Effects of honey on inflammation and nitric oxide production in Wistar rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine* 9(4): 447–452.
- Papastergiou, V. 2014. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: past, present and future. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*.
- Papetti, M. & Herman, I.M. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*.
- Parreira, P., Magalhães, A., Reis, C.A., Borén, T., Leckband, D. & Martins, M.C.L. 2013. Bioengineered surfaces promote specific protein-glycan mediated binding of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Acta Biomaterialia*.
- Patricia, V., Oliverio, V., Triny, L. & Favián, M. 2015. *Meliponini* biodiversity and medicinal uses of pot-honey from El Oro province in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 27(6): 502–506.
- Paul, B., Adimoolam, S., Quereshi, M.J. & Eva, J.J. 2017. Current status of *H. pylori* infection treatment 2017. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 7(10): 190–195.
- Paul, W.E. 1991. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*.
- Pérez, R.A., Sánchez-Brunete, C., Calvo, R.M. & Tadeo, J.L. 2002. Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Perfetto, B., Buommino, E., Canozo, N., Paoletti, I., Corrado, F., Greco, R. & Donnarumma, G. 2004. Interferon-gamma cooperates with *Helicobacter pylori* to induce iNOS-related apoptosis in AGS gastric adenocarcinoma cells. *Research in Microbiology* 155(4): 259–266.
- Perrais, M., Rousseaux, C., Ducourouble, M.P., Courcol, R., Vincent, P., Jonckheere, N. & Van Seuning, I. 2014. *Helicobacter pylori* urease and flagellin alter mucin gene expression in human gastric cancer cells. *Gastric Cancer*.
- Pincock, S. 2005. Nobel prize winners Robin Warren and Barry Marshall. *Lancet*.
- Poon, B.Y., Raharjo, E., Patel, K.D., Tavener, S. & Kubes, P. 2003. Complexity of inducible nitric oxide synthase: cellular source determines benefit versus toxicity. *Circulation*.
- Portal-Celhay, C. & Perez-Perez, G.I. 2006. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clinical Science* 110(3): 305–314.

- Prabhu, V. & Shivani, A. 2014. An overview of history, pathogenesis and treatment of perforated peptic ulcer disease with evaluation of prognostic scoring in adults. *Annals of Medical and Health Sciences Research*.
- Prager, G.W. & Zielinski, C.C. 2013. Angiogenesis in cancer. *Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis*.
- Puscas, A., Hosu, A. & Cimpoiu, C. 2013. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal of Chromatography* 1272: 132–135.
- Pyrzynska, K. & Biesaga, M. 2009. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*.
- QS An-Nahl: 68-69. (t.th.). Al-Qur'an. *Al-Qur'an* Vol. 16.
- Queiroz, D.M.M., Silva, C.I.S.M., Goncalves, M.H.R.B., Braga-neto, M.B., Fialho, A.B.C., Fialho, A.M.N., Rocha, G.A., Rocha, A.M.C., Batista, S.A., Guerrant, R.L., Lima, A.A.M. & Braga, L.L.B.C. 2012. Higher frequency of cagA EPIYA-C phosphorylation sites in *H. pylori* strains from first-degree relatives of gastric cancer patients. *BMC Gastroenterology*.
- Rababah, T.M., Al-Omoush, M., Brewer, S., Alhamad, M., Yang, W., Alrababah, M., Al-Ghzawi, A.A.M., Al-U'datt, M., Ereifej, K., Alsheyab, F., Esoh, R. & Almajwal, A. 2014. Total phenol, antioxidant activity, flavonoids, anthocyanins and color of honey as affected by floral origin found in the arid and semiarid mediterranean areas. *Journal of Food Processing and Preservation*.
- Rabie E, Serem JC, Oberholzer HM, Gaspar ARM & Bester MJ. 2016. How methylglyoxal kills bacteria: An ultrastructural study. *Ultrastructural Pathology* 40(2):107–11.
- Raghavan, S. & Holmgren, J. 2005. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*.
- Raghavan, S. & Quiding-Jarbrink, M. 2012. Immune modulation by regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*.
- Ramakrishna, Y.G., Savithri, K., Kist, M. & Devaraj, S.N. 2015. Aegle marmelos fruit extract attenuates *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induced oxidative stress in Sprague Dawley rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15(1): 1–10 15:375.
- Ramanauskienė, K., Stelmakienė, A., Briedis, V., Ivanauskas, L. & Jakštas, V. 2012. The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. *Food Chemistry* 132(3):1544-1548.

- Ramarao, N. & Meyer, T.F. 2001. *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. *Infection and Immunity* 69(4):2604-2611.
- Ramarao, Nalini, Gray-Owen, S.D., Backert, S. & Meyer, T.F. 2000. *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. *Molecular Microbiology* 37(6):1389-1404.
- Rashed, M.N. & Soltan, M.E. 2004. Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. *Journal of Food Composition and Analysis* 17(6):725-35.
- Rathbone, B.J., Wyatt, J.I., Worsley, B.W., Shires, S.E., Trejdosiewicz, L.K., Heatley, R. V. & Losowsky, M.S. 1986. Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. *Gut* 27(6):642-647.
- Redza-Dutordoir, M. & Averill-Bates, D.A. 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1863(12):2977-2992.
- Reshetnyak, V.I. & Reshetnyak, T.M. 2017. Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. *World Journal of Gastroenterology* 23(27):4867-4878.
- Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Vergara, P., Moreno, M.G. & Muriel, P. 2007. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- κ B, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1770(6):989-996.
- Rinsho, N., Journal, J., Clinical, O.F., Universit, L.C., Donelli, G. & Santa, F. 2015. Virulence factors of *Helicobacter pylori* Virulence Factors of *Helicobacter pylori* 5(October).
- Robin Warren, J. & Marshall, B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet* 321(8336): 1273–1275.
- Robinson, K., White, J. & Winter, J. 2015. Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: etiology and clinical outcomes. *Journal of Inflammation Research* 8: 137.
- Roowi, S., Muhamad, S.A., Sipon, H., Fahimee, M., Nazrul, M. & Daud, H. 2012. Asid fenolik bebas dalam madu Kelulut (Free phenolic acids in Kelulut honey). *Buletin Teknologi MARDI* 2: 145–147.
- Rotter, J. 1983. Peptic ulcer. In Emery AE, Rimoin DL, editors: *the principles and practice of medical genetics* hlm. 863. New York: Churchill Livingstone.
- Roy, S. 2016. Clinical study of peptic ulcer disease. *Asian j. biomed. pharm. sci.* 6(53): 41–43.

- Saba, Z., Suzana, M. & Anum, M.Y. 2013. Honey: food or medicine. *Med & Health* 2013; 8(1): 3–18.
- Sachs, G., Shin, J.M. & Hunt, R. 2010. Novel approaches to inhibition of gastric acid secretion. *Current Gastroenterology Reports*.
- Safavi, M. 2016. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current and future insights. *World Journal of Clinical Cases* 4(1):5-19.
- Sahin, H. 2016. Honey as an apitherapeutic product: its inhibitory effect on urease and xanthine oxidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(3): 490–494.
- Sakagami, T., Dixon, M., O'Rourke, J., Howlett, R., Alderuccio, F., Vella, J., Shimoyama, T. & Lee, A. 1996. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut* 39(5): 639–648.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* 155(3):1151-64.
- Salih, B.A., Abasiyanik, M.F. & Ahmed, N. 2007. A preliminary study on the genetic profile of cag pathogenicity-island and other virulent gene loci of *Helicobacter pylori* strains from Turkey. *Infection, Genetics and Evolution* 7(4):509-512.
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T. & Samini, F. 2017. Honey and health: a review of recent clinical research. *Pharmacognosy Research* 9(2): 121–127.
- Sampieri, C.L. 2013. *Helicobacter pylori* and gastritis: The role of extracellular matrix metalloproteases, their inhibitors, and the disintegrins and metalloproteases - a systematic literature review. *Digestive Diseases and Sciences* 58(10):2777-2783.
- Saremi, K., Rad, S.K., Khalilzadeh, M., Hussaini, J. & Majid, N.A. 2020. *In-vivo* acute toxicity and anti-gastric evaluation of a novel dichloro Schiff base: Bax and HSP70 alteration. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 52(1): 26–37.
- Sarikaya, E. & Doğan, S. 2020. Glutathione peroxidase in health and diseases. *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease*.
- Savoldi, A., Carrara, E., Graham, D., Conti, M. & Tacconelli, E. 2018. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in world health organization regions. *Gastroenterology* 155(5): 1372–1382.
- Sawai, N., Kita, M., Kodama, T., Tanahashi, T., Yamaoka, Y., Tagawa, Y.I., Iwakura, Y. & Imanishi, J. 1999. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infection and Immunity* 67(1):279-285.

- Sawatzky, P., Liu, G., Dillon, J.A.R., Allen, V., Lefebvre, B., Hoang, L., Tyrrell, G., Van Caesele, P., Levett, P. & Martin, I. 2015. Quality assurance for antimicrobial susceptibility testing of neisseria gonorrhoeae in Canada, 2003 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology* 53(11):3646-3649.
- Scarpignato, C., Gatta, L., Zullo, A. & Blandizzi, C. 2016. Effective and safe proton pump inhibitor therapy in acid-related diseases - a position paper addressing benefits and potential harms of acid suppression. *BMC Medicine* 14(1):179.
- Schöttker, B., Adamu, M.A., Weck, M.N. & Brenner, H. 2012. *Helicobacter pylori* infection is strongly associated with gastric and duodenal ulcers in a large prospective study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10(5): 487-493.e1.
- Schramm, D.D., Karim, M., Schrader, H.R., Holt, R.R., Cardetti, M. & Keen, C.L. 2003. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6):1732-1735.
- Schubert, M.L. 2014. Gastric secretion. *Current Opinion in Gastroenterology* 30(6):578-582.
- Schubert, M.L. & Peura, D.A. 2008. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology*.
- Sereia, M.J., Alves, E.M., Toledo, V.A.A., Marchini, L.C., Sekine, E.S., Faquinello, P., de Almeida, D. & Moreti, A.C.C.C. 2011. Physicochemical characteristics and pollen spectra of organic and non-organic honey samples of *Apis mellifera* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 83(3):1077-90.
- Sgouras, D.N., Trang, T.T.H. & Yamaoka, Y. 2015. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 20: 8–16.
- Shay, H., C.H. Sun, D. & Gruenstein, M. 1954. A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat. *Gastroenterology* 26(6):906-913.
- Shehu, A., Adzim, M., Rohin, K., Aziz, A.A. & Ismail, S. 2015. Antibacterial activity and antioxidant capacity of Malaysian Tualang Honey Antibacterial Activity and Antioxidant Capacity of Malaysian Tualang Honey. *International Journal of Science and Research* 12–17.
- Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S. & Humphreys, H. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.
- Shi, T., Liu, W.Z., Gao, F., Shi, G.Y. & Xiao, S.D. 2005. Intranasal CpG-oligodeoxynucleotide is a potent adjuvant of vaccine against *Helicobacter pylori*, and T helper 1 type response and interferon- γ correlate with the protection. *Helicobacter* 10(1):71-79.

- Shimoyama, A., Saeki, A., Tanimura, N., Tsutsui, H., Miyake, K., Suda, Y., Fujimoto, Y. & Fukase, K. 2011. Chemical synthesis of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide partial structures and their selective proinflammatory responses. *Chemistry - A European Journal* 17(51): 14464–14474.
- Shin, J.M. & Kim, N. 2013. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 19(1):25-35.
- Shiotani, A., Cen, P. & Graham, D.Y. 2013. Eradication of gastric cancer is now both possible and practical. *Seminars in Cancer Biology* 23(6 Pt B):492-501.
- Siregar, G., Sari, D. & Sungkar, T. 2017. Serum VEGF levels in *Helicobacter pylori* infection and correlation with *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* genes. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 5(2): 137–141.
- Siregar, G.A., Halim, S. & Sitepu, V.R. 2015. Serum TNF- α , IL-8, VEGF levels in *Helicobacter pylori* infection and their association with degree of gastritis. *Acta medica Indonesiana* 47(2):120-126.
- Smith, J.L. 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *Journal of Food Protection* 66(7):1292-1303.
- Smith, M.F., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A.M., Ryan, K., Crowe, S. & Goldberg, J.B. 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 278(35):32552-32560.
- Smith, S.B., Snow, A.N., Perry, R.L. & Qasem, S.A. 2012. *Helicobacter pylori*: To stain or not to stain? *American Journal of Clinical Pathology* 137(5):733-738.
- Smith, T., Legel, K. & Hanft, J.R. 2009. Topical *Leptospermum* honey (Medihoney) in recalcitrant venous leg wounds: a preliminary case series. *Advances in skin & wound care* 22(2):68-71.
- Smolka, A.J. & Backert, S. 2012. How *Helicobacter pylori* infection controls gastric acid secretion. *Journal of Gastroenterology* 47(6):609-618.
- Sousa, J.M., de Souza, E.L., Marques, G., Meireles, B., de Magalhães Cordeiro, Â.T., Gullón, B., Pintado, M.M. & Magnani, M. 2016. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by *Meliponini* in the Brazilian semiarid region. *Food Research International* 84:61-68.
- Souza, M. do C., Beserra, A.M.S., Martins, D.C., Real, V.V., Santos, R.A.N. dos, Rao, V.S., Silva, R.M. da & Martins, D.T. de O. 2009. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal of Ethnopharmacology*. 123(3): 452–458.

- Su, B., Ceponis, P.J.M., Lebel, S., Huynh, H. & Sherman, P.M. 2003. *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infection and Immunity* 71(6):3496-3502.
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Mogami, S. & Hibi, T. 2012. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 50(1):35-39.
- Tan, H.J., Rizal, A.M., Rosmadi, M.Y. & Goh, K.L. 2005. Distribution of *Helicobacter pylori* *cagA*, *cagE* and *vacA* in different ethnic groups in Kuala Lumpur, Malaysia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 20(4): 589–594.
- Tan, H.T., Rahman, R.A., Gan, S.H., Halim, A.S., Hassan, S.A., Sulaiman, S.A. & BS, K.K. 2009. The antibacterial properties of Malaysian Tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to Manuka honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9: 34.
- Tanaka, H., Yoshida, M., Nishiumi, S., Ohnishi, N., Kobayashi, K., Yamamoto, K., Fujita, T., Hatakeyama, M. & Azuma, T. 2010. The *cagA* protein of *Helicobacter pylori* suppresses the functions of dendritic cell in mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 498(1):35-42.
- Tandon, R., Khanna, H.D., Dorababu, M. & Goel, R.K. 2004. Oxidative stress and antioxidants status in peptic ulcer and gastric carcinoma. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 48(1):115-118.
- Tang, C.L., Ye, F., Liu, W., Pan, X.L., Qian, J. & Zhang, G.X. 2012. Eradication of *Helicobacter pylori* infection reduces the incidence of peptic ulcer disease in patients using nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. *Helicobacter* 17(4): 286–296.
- Tartibian, B. & Maleki, B.H. 2012. The effects of honey supplementation on seminal plasma cytokines, oxidative stress biomarkers, and antioxidants during 8 weeks of intensive cycling training. *Journal of Andrology* 33(3):449-461.
- Tegtmeyer, N., Wessler, S. & Backert, S. 2011. Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS Journal* 278(8):1190-1202.
- Terrab, A., González, A.G., Díez, M.J. & Heredia, F.J. 2003. Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *European Food Research and Technology* 218(1):88-95.
- Tewari, J. & Irudayaraj, J. 2004. Quantification of saccharides in multiple floral honeys using fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(11):3237-3243.
- Thrift, A.P. & El-Serag, H.B. 2020. Burden of Gastric Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 18(3):534-542.

- Tomblin, V., Ferguson, L.R., Han, D.Y., Murray, P. & Schlothauer, R. 2014. Potential pathway of anti-inflammatory effect by New Zealand honeys. *International Journal of General Medicine* 7:149-158.
- Tonks, A., Cooper, R.A., Price, A.J., Molan, P.C. & Jones, K.P. 2001. Stimulation of TNF- α release in monocytes by honey. *Cytokine* 14(4): 240–242.
- Tosi, M.F. & Czinn, S.J. 1990. Opsonic activity of specific human IgG against *Helicobacter pylori*. *Journal of Infectious Diseases* 162(1):156-162.
- Trowers, E., Tischler, M., Trowers, E. & Tischler, M. 2014. Gastrointestinal secretion: aids in digestion and absorption. *Gastrointestinal Physiology* 53-80.
- Tsang, K.K., Kwong, E.W.Y., Woo, K.Y., To, T.S.S., Chung, J.W.Y. & Wong, T.K.S. 2015. The anti-inflammatory and antibacterial action of nanocrystalline silver and manuka honey on the molecular alternation of diabetic foot ulcer: A comprehensive literature review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*.
- Tuccillo, C., Cuomo, A., Rocco, A., Martinelli, E., Staibano, S., Mascolo, M., Gravina, A.G., Nardone, G., Ricc, V., Ciardiello, F., Del Vecchio Blanco, C. & Romano, M. 2005. Vascular endothelial growth factor and neo-angiogenesis in *H. pylori* gastritis in humans. *Journal of Pathology* 207(3): 277–284.
- Tummala, S., Keates, S. & Kelly, C.P. 2004. Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. *Current Opinion in Gastroenterology* 20(6):592-597.
- Turner J.R. 2014. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th Ed., 749-819.
- Ulleberg, E.K., Comi, I., Holm, H., Herud, E.B., Jacobsen, M. & Vegarud, G.E. 2011. Human gastrointestinal juices intended for use in *in-vitro* digestion models. *Food Digestion* 2(1-3):52-61.
- Urbas, R., Huntington, W., Napoleon, L., Wong & Mullin. 2016. Malabsorption-related issues associated with chronic proton pump inhibitor usage. *Austin Journal of Nutrition and Metabolism* 3(2):1041.
- Vandamme, L., Heyneman, A., Hoeksema, H., Verbelen, J. & Monstrey, S. 2013. Honey in modern wound care: a systematic review. *Burns* 39(8):1514-1525.
- Varela-Chinchilla, C. D., & Segura, N. 2021. Histology, Parietal Cells. *In StatPearls*.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J.A. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science* 73(9):R117-R124.

- Vorobjova, T., Nilsson, I., Terjajev, S., Granholm, M., Lyyra, M., Porkka, T., Prück, T., Salupere, R., Maaros, H.I., Wadström, T. & Uibo, R. 2006. Serum antibodies to enterohepatic *Helicobacter* spp. in patients with chronic liver diseases and in a population with high prevalence of *H. pylori* infection. *Digestive and Liver Disease* 38(3): 171–176.
- Voulgaridou, G.P., Anestopoulos, I., Franco, R., Panayiotidis, M.I. & Pappa, A. 2011. DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711(1-2): 13-27.
- Wang, A.Y. & Peura, D.A. 2011. The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease and upper gastrointestinal bleeding throughout the world. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* 21(4):613-635.
- Wallace, J.L. & Miller, M.J.S. 2000. Nitric oxide in mucosal defense: A little goes a long way. *Gastroenterology* 119(2): 512–520.
- Wang, F., Meng, W., Wang, B. & Qiao, L. 2014. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Letters* 345(2):196-202.
- Watanabe, T., Higuchi, K., Tominaga, K., Fujiwara, Y. & Arakawa, T. 2001. Acid regulates inflammatory response in a rat model of induction of gastric ulcer recurrence by interleukin 1 β . *Gut* 48(6):774–781.
- Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R. & Sachs, G. 2000. A H⁺-gated urea channel: The link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 287(5452):482-485.
- Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews* 182:207-214.
- Werawatganon, D. 2014. Simple animal model of *Helicobacter pylori* infection. *World journal of gastroenterology : WJG* 20(21): 6420–6424.
- White, J.W., Subers, M.H. & Schepartz, A.I. 1963. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 73(1): 57–70.
- Whittle, B.J.R., Lopez-Belmonte, J. & Moncada, S. 1990. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: Interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *British Journal of Pharmacology* 99(3):607-611.
- Xiong, Q., Tezuka, Y., Kaneko, T., Li, H., Tran, L.Q., Hase, K., Namba, T. & Kadota, S. 2000. Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages. *European Journal of Pharmacology* 400(1):137-44.
- Yaacob, M., Rajab, N.F., Shahar, S. & Sharif, R. 2017. Stingless bee honey and its potential value: a systematic review. *Food Research* 2(2): 124–133.

- Yaghoobi, R., Kazerouni, A. & kazerouni, O. 2013. Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant and anti-viral agent: A review. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 8(3): 100–104.
- Yamaoka, Y. 2010. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 7(11): 629–641.
- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F., Martos, I. & Singanusong, R. 2003. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry* 81(2): 159–168.
- Yap, S.K., Chin, N.L., Yusof, Y.A. & Chong, K.Y. 2019. Quality characteristics of dehydrated raw Kelulut honey. *International Journal of Food Properties* 22(1): 556–571.
- Yazan, L.S., Muhamad Zali, M.F.S., Ali, R.M., Zainal, N.A., Esa, N., Sapuan, S., Ong, Y.S., Tor, Y.S., Gopalsamy, B., Voon, F.L. & Syed Alwi, S.S. 2016. Chemopreventive properties and toxicity of Kelulut honey in Sprague Dawley rats induced with azoxymethane. *BioMed Research International*.
- Yazan, L.S., Zainal, N.A., Ali, R.M., Muhamad Zali, M.F.S., Sze, O.Y., Sim, T.Y., Gopalsamy, B., Ling, V.F., Sapuan, S., Esa, N., Haron, A.S., Ansar, F.H.Z., Mokhtar, A.M.A. & Alwi, S.S.S. 2018. Antiulcer properties of Kelulut honey against ethanol-induced gastric ulcer. *Pertanika Journal of Science and Technology* 26(1): 121–132.
- Yeo, M., Kim, D.K., Han, S.U., Lee, J.E., Kim, Y.B., Cho, Y.K., Kim, J.H., Cho, S.W. & Hahm, K.B. 2006. Novel action of gastric proton pump inhibitor on suppression of *Helicobacter pylori* induced angiogenesis. *Gut* 55(1): 26–33.
- Yoon, H., Lee, D.H., Jang, E.S., Kim, J., Shin, C.M., Park, Y.S., Hwang, J.H., Kim, J.W., Jeong, S.H. & Kim, N. 2016. Effects of n-acetylcysteine on first-line sequential therapy for *Helicobacter pylori* infection: a randomized controlled pilot trial. *Gut and Liver* 10(4):520-5.
- Yordanov, D., Boyanova, L., Markovska, R., Ilieva, J., Andreev, N., Gergova, G. & Mitov, I. 2017. Influence of dietary factors on *Helicobacter pylori* and *cagA* seroprevalence in Bulgaria. *Gastroenterology Research and Practice* 1–7.
- Yuan, Y., Ford, A.C., Khan, K.J., Gisbert, J.P., Forman, D., Leontiadis, G.I., Tse, F., Calvet, X., Fallone, C., Fischbach, L., Oderda, G., Bazzoli, F. & Moayyedi, P. 2013. Optimum duration of regimens for *Helicobacter pylori* eradication. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (12):CD008337.
- Zainol, M.I., Mohd Yusoff, K. & Mohd Yusof, M.Y. 2013. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13(1): 1.

- Zamani, M., Ebrahimitabar, F., Zamani, V., Miller, W.H., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J. & Derakhshan, M.H. 2018. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 47(7):868-876.
- Zamorano, J., Rivas, M.D. & Pérez-G, M. 2003. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Inmunologia* 22:215-4.
- Zhang, M. 2015. High antibiotic resistance rate: a difficult issue for *Helicobacter pylori* eradication treatment. *World Journal of Gastroenterology* 21(48):13432-7.
- Zhang, X.Y., Zhang, P.Y. & Aboul-Soud, M.A.M. 2017. From inflammation to gastric cancer: role of *Helicobacter pylori*. *Oncology Letters* 13(2):543-548.
- Ziyad, S. & Iruela-Arispe, M.L. 2011. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Genes and Cancer* 2(12):1085-96.



LAMPIRAN A

SIJIL KELULUSAN ETIKA PENGGUNAAN HAIWAN DARIPADA
UKMAEC

Jawatankuasa Etika Haiwan

Animal Ethics Committee

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

Profesor Madya Dr. Nur Azlina Mohd Fahmi,
Jabatan Farmakologi,
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:
"Nutrapharmacology of Tualang and Kelulut honey for gastric ulcers diseases in rats."

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

FAR/PP/2016/AZLINA/28-SEPT./786-OCT.-2016-OCT.-2019

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

LAMPIRAN B

PROSEDUR KIT BAGI PENENTUAN MDA

Elabscience®

8th Edition, revised in February, 2018
(FOR RESEARCH USE ONLY. DO NOT USE IT IN CLINICAL DIAGNOSIS !)

Malondialdehyde (MDA) Assay Kit

Catalog No: E-BC-K142
Method: Colorimetric method
Specification: 100 Assays

This manual must be read attentively and completely before using this product.

If you have any problem, please contact our Technical Service Center for help.

Phone: 240-252-7368(USA) Fax: 240-252-7376(USA)
Email: techsupport@elabscience.com
Website: www.elabscience.com

Please kindly provide us the lot number (on the outside of the box) of the kit for more efficient service.

Copyright ©2018-2019 Elabscience Biotechnology Inc. All Rights Reserved.

8th Edition, revised in February, 2018

2. Preparation of tissue samples:
Add Extract Solution into the tissue sample according to the ratio of **Weight (g): Extract Solution (mL) = 1: 5-10** (it is recommended to add 1 mL of Extract Solution into 0.1 g of tissue), then homogenize the sample on ice. Centrifuge the tissue homogenate at 8000 g for 10 min at 4°C. Take the supernatant and preserve it on ice for detection. Meanwhile, determine the protein concentration of supernatant (E-BC-K318, E-BC-K168, E-BC-K165).

3. Serum / plasma samples:
Detect the serum or plasma samples directly.

Detection procedures

- Add 0.1 mL of Reagent 2 into a 1.5 mL centrifuge tube, then add 0.1 mL of sample, mix fully.
- Incubate at 95°C for 30 min (cover the cap to prevent the loss of water), then cool the tubes in ice-bath. Centrifuge at 10000 g for 10 min at 25°C.
- Take 200 µL of the supernatant into the micro quartz cuvette or 96 wells Microplate. Measure the absorbance value at 532 nm and 600 nm. $\Delta A = A_{532} - A_{600}$.

Calculation of results

Calculation formula for detection with quartz cuvette:

- Calculation formula of MDA content in serum (plasma)**
MDA content (nmol/mL)

$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{Cpr}) \times 10^3 = V_{sample} \times 25.8 \times \Delta A$$
- Calculation formula of MDA content in tissue, bacteria or cells samples:**
 - Calculate according to the protein concentration of sample:**
MDA content (nmol/mg prot)

$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{Cpr}) \times 10^3 = (Cpr \times V_{sample}) \times 25.8 \times \Delta A \times Cpr$$
 - Calculate according to the weight (fresh weight) of sample:**
MDA content (nmol/g fresh weight)

$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{W}) \times 10^3 = \frac{W \times V_{sample}}{V_{total sample}} \times 25.8 \times \Delta A \times W$$
 - Calculate according to the density of bacteria or cells:**
MDA content (nmol/10⁶ cells)

$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{Cpr}) \times 10^3 = \frac{Cpr \times V_{sample}}{V_{total sample}} \times 0.0516 \times \Delta A$$

www.elabscience.com

8th Edition, revised in February, 2018

V total: total volume of reaction system, 4 × 10⁻⁴ L;
ε: molar extinction coefficient of MDA, 1.55 × 10⁵ L/mol/cm;
d: optical path of the quartz cuvette, 1 cm;
V sample: volume of sample added into the reaction system, 0.1 mL;
V total sample: volume of the added extract solution, 1 mL;
W: weight of sample, g;
Cpr: concentration of protein in sample, mg/mL;
500: total amount of bacteria or cells, 5 × 10⁶.

Calculation formula for detection with Microplate:

- Calculation formula of MDA content in serum (plasma)**
MDA content (nmol/mL)

$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{Cpr}) \times 10^3 = V_{sample} \times 51.6 \times \Delta A$$
- Calculation formula of MDA content in tissue, bacteria or cells samples:**
 - Calculate according to the protein concentration of sample:**
MDA content (nmol/mg prot)

$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{Cpr}) \times 10^3 = (Cpr \times V_{sample}) \times 51.6 \times \Delta A \times Cpr$$
 - Calculate according to the weight (fresh weight) of sample:**
MDA content (nmol/g fresh weight)

$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{W}) \times 10^3 = \frac{W \times V_{sample}}{V_{total sample}} \times 51.6 \times \Delta A \times W$$
 - Calculate according to the density of bacteria or cells:**
MDA content (nmol/10⁶ cells)

$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{Cpr}) \times 10^3 = \frac{Cpr \times V_{sample}}{V_{total sample}} \times 0.1032 \times \Delta A$$

V total: total volume of reaction system, 4 × 10⁻⁴ L;
ε: molar extinction coefficient of MDA, 1.55 × 10⁵ L/mol/cm;
d: optical path of the Microplate well, 0.5 cm;
V sample: volume of sample added into the reaction system, 0.1 mL;
V total sample: volume of the added extract solution, 1 mL;
W: weight of sample, g;
Cpr: concentration of protein in sample, mg/mL;
500: total amount of bacteria or cells, 5 × 10⁶.

www.elabscience.com

8th Edition, revised in February, 2018

Notes

- The kit is for scientific research only.
- Instructions should be followed strictly, changes of operation may result in unreliable results.
- The validity of kit is 3 months.
- Do not use components from different batches of kit.
- If the MDA content is calculated by concentration, the protein concentration of the sample needs to be determined separately (E-BC-K318, E-BC-K168, E-BC-K165).

Copyright ©2018-2019 Elabscience Biotechnology Inc. All Rights Reserved.

LAMPIRAN D

PROSEDUR KIT BAGI PENENTUAN SOD

Elabscience®

8th Edition, revised in February, 2018

(FOR RESEARCH USE ONLY. DO NOT USE IT IN CLINICAL DIAGNOSIS !)

Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit

Catalog No: E-BC-K020

Method: WST-1 Method

Specification: 96T

This manual must be read attentively and completely before using this product.

If you have any problem, please contact our Technical Service Center for help.

Phone: 240-252-7368(USA) Fax: 240-252-7376(USA)

Email: techsupport@elabscience.com

Website: www.elabscience.com

Please kindly provide us the lot number (on the outside of the box) of the kit for more efficient service.

8th Edition, revised in February, 2018

Application

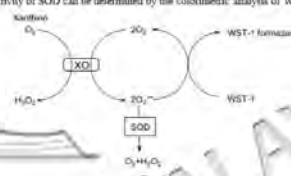
This kit can be used to measure Total Superoxide Dismutase (T-SOD) activity in serum, plasma, pleural effusion, ascites, urine, cells, animal and plant tissues samples.

Detection significance

Superoxide dismutase is an enzyme that alternately catalyzes the dismutation (or partitioning) of the superoxide ($O_2^{\cdot -}$) radical into either ordinary molecular oxygen (O_2) or hydrogen peroxide (H_2O_2). Superoxide is produced as a by-product of oxygen metabolism and, if not regulated, causes many types of cell damage. Hydrogen peroxide is also damaging and is degraded by other enzymes such as catalase. Thus, SOD is an important antioxidant defense in nearly all living cells exposed to oxygen. One exception is *Lactobacillus plantarum* and related lactobacilli, which use a different mechanism to prevent damage from reactive ($O_2^{\cdot -}$).

Detection principle

The activity of SOD was measured by WST-1 method in this kit and the principles of the WST-1 method refer to Fig.1. Xanthine Oxidase (XO) can catalyze WST-1 react with O_2 to generate a water-soluble formazan dye. SOD can catalyze the disproportionation of superoxide anions, so the reaction can be inhibited by SOD, and the activity of SOD is negatively correlated with the amount of formazan dye. Therefore, the activity of SOD can be determined by the colorimetric analysis of WST-1 products.



8th Edition, revised in February, 2018

Kit components

Components	Specifications	Storage
Reagent 1	Buffer Solution	24 mL × 1 vial 2-8°C, 6 months
Reagent 2	Substrate Solution	0.14 mL × 1 vial 2-8°C, 6 months, shading light
Preparation of substrate application solution: Mix the Reagent 1 and Reagent 2 at the ratio of 200:1 thoroughly. Prepare the fresh solution before use and the unused substrate application solution can be stored at 2-8°C for 7 days.		
Reagent 3	Enzyme Stock Solution	0.3 mL × 1 vial -20°C, 6 months
Reagent 4	Enzyme Diluent	1.5 mL × 2 vials 2-8°C, 6 months

Preparation of enzyme working solution: Mix the Reagent 3 and Reagent 4 at the ratio of 1:10 thoroughly. Prepare the fresh solution before use and the unused enzyme working solution can be stored at 2-8°C for 7 days.

Note: Reagent 2 should melt slowly on ice. It is recommended to aliquot the Reagent 2 into smaller quantities for optimal storage. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Bring all reagents to room temperature before use.

Experimental instrument

96-well microplate, Micropipette, Multichannel pipettor, Vortex mixer, Centrifuge, Microplate reader (450 nm)

Operation procedures

1. Serum/plasma:

- (1) Observe the serum/plasma samples, centrifuge for 10 min at 2000 g if it's muddy. Collect the supernatant and carry out the assay immediately.
- (2) The supernatant is diluted into difference concentration with normal saline, then take the pre-experiment.

2. Tissue:

10% tissue homogenate: It is recommended to get detailed references from other literatures before assay among at different tissue types. Mince the tissues to small pieces, then be weighed and homogenized in normal saline on ice, the volume of normal saline (mL): the weight of the tissue (g) = 9:1. The tissue homogenate is centrifuged for 10 min at 1500 g. Collect the supernatant and carry out the assay immediately. The supernatant is diluted into difference concentration with PBS, then take the pre-experiment. Meanwhile, determine the protein concentration of supernatant (E-BC-K318, E-BC-K168, E-BC-K165).

Note: The supernatant must be clarification, the rotational speed and time can be increased appropriately.

8th Edition, revised in February, 2018

Cells:

- (1) Adherent cells should be detached with trypsin or a cell scraper and then collected sedimentary cells by centrifugation. (Suspension cells can be collected sediment by centrifugation directly). Centrifuge for 10 min at 1000 g, discard supernatant.
- (2) Resuspend sedimentary cells in 1 mL cold PBS, centrifuge for 10 min at 1000 g, discard supernatant.
- (3) Resuspend cells in PBS (1:9 or normal saline). Sonicate or grind with hand-operated in ice water bath to break the cells. (or Freeze cells at $\leq -20^\circ\text{C}$. Thaw cells with gentle mixing. Repeat the freeze-thaw cycle five 3 times.)
- (4) The cell homogenate is centrifuged at 1500 g for 10 min. Collect the supernatant and preserve it on ice for detection. Meanwhile, determine the protein concentration of supernatant (E-BC-K318, E-BC-K168, E-BC-K165).

Operation steps

1. **Control well:** add 20 μL of double distilled water and 20 μL of enzyme working solution.

Blank_{control} well: Add 20 μL of double distilled water and 20 μL of enzyme diluent.

Sample well: Add 20 μL of Sample and 20 μL of enzyme working solution.

Blank_{sample} well: add 20 μL of Sample and 20 μL of enzyme diluent.

2. Add 200 μL of substrate application solution with a multi-channel pipettor into each well and mix fully.

3. Incubate at 37°C for 20 min. Measure the OD values of each well with Microplate Reader.

Note: The following operating table could be as a reference.

	Control well	Blank _{control} well	Sample well	Blank _{sample} well
Sample (μL)			20	20
dH ₂ O (μL)	20	20		
Enzyme working solution (μL)	20		20	
Enzyme diluent (μL)		20		20
Substrate application solution (μL)	200	200	200	200

Mix fully and incubate at 37°C for 20 min. Measure the OD values of each well with Microplate Reader.

(Notice): Control, Blank_{control} only need 1-2 wells for each experiment.

Note

- (1) In order to reduce errors in different well, please use multiple-channel pipettes to add substrate application solution.
- (2) It is recommended to take a 96 wells microplate and a multi-channel pipettor for operation to reduce errors between wells, mix fully to ensure the samples fully contact with reagents.

3. The SOD inhibition ratio can arrive 100%.
4. Before the formal experiment, it needs to choose one or two samples for diluting a series of diluent and determine the dilution factor when the SOD inhibition ratio is 40%~60%.

Calculation of results

1. Definition:

When SOD inhibition ratio in this reaction system reach 50%, the corresponding enzyme level is 1 SOD activity unit (U).

2. Calculation formula:

(1) For serum/plasma sample:

Inhibition ratio of SOD (%)

$$= \frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Blank control}}) - (A_{\text{Sample}} - A_{\text{Blank sample}})}{A_{\text{Control}} - A_{\text{Blank control}}} \times 100\%$$

SOD activity (U/mL)

$$= \text{Inhibition ratio of SOD (\%)} \div 50\% \times \left(\frac{240 \mu\text{L}}{20 \mu\text{L}}\right) \times \text{Dilution factor of sample before tested}$$

(2) For tissue and cells:

Inhibition ratio of SOD (%)

$$= \frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Blank control}}) - (A_{\text{Sample}} - A_{\text{Blank sample}})}{A_{\text{Control}} - A_{\text{Blank control}}} \times 100\%$$

SOD activity (U/mg prot)

$$= \text{Inhibition ratio of SOD (\%)} \div 50\% \times \left(\frac{240 \mu\text{L}}{20 \mu\text{L}}\right) \times \text{Dilution factor of sample before tested} \\ \div \text{Protein concentration of sample (mgprot/mL)}$$

Technical parameters

1. The sensitivity of the kit is 0.2 U/mL.
2. The detection range of the kit is 0.2 -14.4 U/mL
3. The intra-assay CV is 2.9 % and the inter-assay CV is 3.7%.
4. The recovery of the kit is 97 %.

Notes

1. This kit is for research use only.
2. Instructions should be followed strictly, changes of operation may result in unreliable results.
3. The validity of kit is 6 months.
4. Do not use components from different batches of kit.

LAMPIRAN E

PROSEDUR KIT BAGI PENENTUAN GPx

Elabscience®

8th Edition, revised in February, 2018
(FOR RESEARCH USE ONLY. DO NOT USE IT IN CLINICAL DIAGNOSIS !)

Glutathione Peroxidase (GPx) Assay Kit

Catalog No: E-BC-K148
Method: Colorimetric method
Specification: 100 Assays

This manual must be read attentively and completely before using this product.

If you have any problems, please contact our Technical Service Center for help.

Phone: 240-252-7368(USA) Fax: 240-252-7376(USA)
Email: techsupport@elabscience.com
Website: www.elabscience.com

Please kindly provide us the lot number (on the outside of the box) of the kit for more efficient service.

Copyright ©2018-2019 Elabscience Biotechnology Inc. All Rights Reserved

8th Edition, revised in February, 2018

the supernatant and preserve it on ice for detection.

2. Preparation of tissue samples:
Add Reagent 1 into the tissue sample according to the ratio of Weight (g): Reagent 1 (mL) = 1:5-10 (it is recommended to add 1 mL of Reagent 1 into 0.1 g tissue), then homogenize the sample on ice. Centrifuge the tissue homogenate at 8000g for 10 min at 4°C. Take the supernatant and preserve it on ice for detection.

3. Serum / plasma samples:
Detect the serum or plasma samples directly.

Detection procedures

- Preheat the Spectrophotometer or Microplate Reader for 30 min, then adjust the wavelength at 340 nm and set to zero with distilled water.
- Incubate the Mixed Reagent at 37°C (for mammal samples) or 25°C (for samples from other species) for 30 min before detection.
- Operation table

	Sample tube /well
Reagent 4 (μL)	20
Mixed Reagent (μL)	160
Supernatant (μL)	20

Mix fully, measure the absorbance at 340 nm at 10 second (A1) and 190 second (A2), respectively.
 $\Delta A = A1 - A2$.

Calculation of results

Calculation formula for detection with quartz cuvette:

1. Calculate according to the protein concentration of sample:
Definition: The oxidation amount of 1 nmol of NADPH catalyzed by 1 mg of protein per minute is defined as 1 unit.
GSH-PX activity (nmol/min/mg prot)
$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{\epsilon \times d}) \times 10^3 \div (C_{pr} \times V_{sample}) \times T = 536 \times \Delta A \times C_{pr}$$

2. Calculate according to the fresh weight of sample:
Definition: The oxidation amount of 1 nmol of NADPH catalyzed by 1 g of sample per minute is defined as 1 unit.
GSH-PX activity (nmol/min/g)
$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{\epsilon \times d}) \times 10^3 \div (\frac{W \times V_{sample}}{W_{total sample}}) \times T = 536 \times \Delta A \times W$$

www.elabscience.com
3

8th Edition, revised in February, 2018

3. Calculate according to the density of bacteria or cells:
Definition: The oxidation amount of 1 nmol of NADPH catalyzed by 1×10^6 of bacteria or cells per minute is defined as 1 unit.
GSH-PX activity (nmol/min/ 10^6 cells)
$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{\epsilon \times d}) \times 10^3 \div (\frac{\text{Number of cells} \times V_{sample}}{V_{total sample}}) \times T = 536 \times \Delta A \times \text{Number of cells}$$

4. Calculate according to the volume of sample:
Definition: The oxidation amount of 1 nmol of NADPH catalyzed by 1 mL of sample per minute is defined as 1 unit.
GSH-PX activity (nmol/min/mL)
$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{\epsilon \times d}) \times 10^3 \div V_{sample} \times T = 536 \times \Delta A$$

V total: total volume of reaction system, 2×10^{-4} L;
ε: molar extinction coefficient of NADPH, 6.22×10^3 L/mol/cm;
d: optical path of the quartz cuvette, 1 cm;
V sample: volume of sample added into the reaction system, $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2}$ mL;
V total sample: volume of the added extract solution, 1 mL;
T: reaction time, 3 min;
W: weight of sample, g;
Cpr: concentration of protein in sample, mg/mL.

Calculation formula for detection with Microplate:

1. Calculate according to the protein concentration of sample:
Definition: The oxidation amount of 1 nmol of NADPH catalyzed by 1 mg of protein per minute is defined as 1 unit.
GSH-PX activity (nmol/min/mg prot)
$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{\epsilon \times d}) \times 10^3 \div (C_{pr} \times V_{sample}) \times T = 0.72 \times \Delta A \times C_{pr}$$

2. Calculate according to the fresh weight of sample:
Definition: The oxidation amount of 1 nmol of NADPH catalyzed by 1 g of sample per minute is defined as 1 unit.
GSH-PX activity (nmol/min/g)
$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{\epsilon \times d}) \times 10^3 \div (\frac{W \times V_{sample}}{W_{total sample}}) \times T = 0.72 \times \Delta A \times W$$

www.elabscience.com
4

8th Edition, revised in February, 2018

3. Calculate according to the density of bacteria or cells:
Definition: The oxidation amount of 1 nmol of NADPH catalyzed by 1×10^6 of bacteria or cells per minute is defined as 1 unit.
GSH-PX activity (nmol/min/ 10^6 cells)
$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{\epsilon \times d}) \times 10^3 \div (\frac{\text{Number of cells} \times V_{sample}}{V_{total sample}}) \times T = 0.72 \times \Delta A \times \text{Number of cells}$$

4. Calculate according to the volume of sample:
Definition: The oxidation amount of 1 nmol of NADPH catalyzed by 1 mL of sample per minute is defined as 1 unit.
GSH-PX activity (nmol/min/mL)
$$= (\Delta A \times \frac{V_{total}}{\epsilon \times d}) \times 10^3 \div V_{sample} \times T = 0.72 \times \Delta A$$

V total: total volume of reaction system, 2×10^{-4} L;
ε: molar extinction coefficient of NADPH, 6.22×10^3 L/mol/cm;
d: optical path of the Microplate, 0.5 cm;
V sample: volume of sample added into the reaction system, $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2}$ mL;
V total sample: volume of the added extract solution, 1 mL;
T: reaction time, 3 min;
W: weight of sample, g;
Cpr: concentration of protein in sample, mg/mL.

Notes

- The sample treatment should be operated on ice, and the enzyme activity should be measured on the same day.
- The mixed reagent and substrate solution must be prepared before experiment. Keep the reagents on ice and use out in a day.
- The detection procedure should be operated quickly.
- For determination of GSH-PX activity of cells samples, the cell number should be $3 \times 10^5 - 5 \times 10^5$. The extraction of GSH-PX in cells can be processed by homogenization or ultrasonic treatment after addition of Reagent 1, and the cells cannot be treated with cell lysate.
- The kit is for scientific research only.
- Instructions should be followed strictly, changes of operation may result in unreliable results.
- The validity of kit is 3 months.
- Do not use components from different batches of kit.

Copyright ©2018-2019 Elabscience Biotechnology Inc. All Rights Reserved

LAMPIRAN F

PROSEDUR KIT BAGI PENENTUAN PROTEIN SITOKIN IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p, IFN- γ , TNF- α dan VEGF



MILLIPLEX® MAP

RAT CYTOKINE / CHEMOKINE MAGNETIC BEAD PANEL 96-Well Plate Assay

RECYTMAG-65K,
RECYMAG65K27PMX,
RECYMAG65PMX27BK

Rat Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel

96-Well Plate Assay

Cat. # RECYTMAG-65K,
RECYMAG65K27PMX,
RECYMAG65PMX27BK

TABLE OF CONTENTS

PAGE

Introduction	2
Principle	3
Storage Conditions Upon Receipt	3
Reagents Supplied	4
Materials Required But Not Provided	6
Safety Precautions	6
Technical Guidelines	8
Sample Collection And Storage	9
Preparation of Reagents for Immunoassay	10
Immunoassay Procedure	13
Plate Washing	15
Equipment Settings	15
Quality Controls	16
Assay Characteristics	17
Troubleshooting Guide	20
Replacement Reagents	22
Ordering Information	24
Well Map	25

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

By purchasing this product, which contains fluorescence labeled microsphere beads authorized by Luminex® Corporation ("Luminex®"), you, the customer, acquire the right under Luminex®'s patent rights, if any, to use this product or any portion of this product, including without limitation the microsphere beads contained herein, only with Luminex®'s laser based fluorescent analytical test instrumentation marketed under the name of Luminex® 100™ IS, 200™, HTS, FLEXMAP 30® MAGPIX®.

TECHNICAL GUIDELINES

To obtain reliable and reproducible results, the operator should carefully read this entire manual and fully understand all aspects of each assay step before running the assay. The following notes should be reviewed and understood before the assay is set up.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

- Do not use beyond the expiration date on the label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- The Antibody-Immobilized Beads are light sensitive and must be protected from light at all times. Cover this assay plate containing beads with opaque plate lid or aluminum foil during all incubation steps.
- It is important to allow all reagents to warm to room temperature (20-25°C) before use in the assay.
- Incomplete washing can adversely affect the assay outcome. All washing must be performed with the Wash Buffer provided.
- The standards prepared by serial dilution must be used within 1 hour of preparation. Discard any unused standards except the standard stock which may be stored at $\leq -20^\circ\text{C}$ for 1 month and at $\leq -80^\circ\text{C}$ for greater than one month.
- If samples fall outside the dynamic range of the assay, further dilute the samples with the appropriate diluent and repeat the assay.
- Any unused mixed Antibody-Immobilized Beads may be stored in the Mixing Bottle at $2-8^\circ\text{C}$ for up to one month.
- During the preparation of the standard curve, make certain to mix the higher concentration well before making the next dilution. Use a new tip with each dilution.
- The plate should be read immediately after the assay is finished. If, however, the plate cannot be read immediately, seal the plate, cover with aluminum foil or an opaque lid, and store the plate at $2-8^\circ\text{C}$ for up to 24 hours. Prior to reading, agitate the plate on the plate shaker at room temperature for 10 minutes. Delay in reading a plate may result in decreased sensitivity for some analytes.
- The filter plate shaker should be set at a speed to provide maximum orbital mixing without splashing of liquid outside the wells. For the recommended plate shaker, this would be a setting of 5-7 which is approximately 500-600 rpm.
- Ensure that the needle probe is clean. This may be achieved by sonication and/or alcohol flushes.
- When reading the assay on Luminex® 200™, adjust probe height according to the protocols recommended by Luminex® to the kit solid plate or to the recommended EMD Millipore filter plates using 3 alignment discs. When reading the assay on MAGPIX®, adjust probe height according to the protocols recommended by Luminex® to the kit solid plate or to the recommended EMD Millipore filter plates using 2 alignment discs. When reading the assay on FLEXMAP 30®, adjust probe height according to the protocols recommended by Luminex® to the kit solid plate using 1 alignment disc.
- For FLEXMAP 30® when using the solid plate in the kit, the final resuspension should be with 150 μL Sheath Fluid in each well and 75 μL should be aspirated.
- For cell culture supernatants or tissue extraction, use the culture or extraction medium as the matrix solution in background, standard curve and control wells. If samples are diluted in assay buffer, use the assay buffer as matrix.

TECHNICAL GUIDELINES (continued)

- For serum/plasma samples that require further dilution beyond 1:2, use the Assay Buffer provided in the kit.
- For cell/tissue homogenate, the final cell or tissue homogenate should be prepared in a buffer that has a neutral pH, contains minimal detergents or strong denaturing detergents, and has an ionic strength close to physiological concentration. Avoid debris, cells, and cell/tissue aggregates. Centrifuge samples before use.
- Vortex all reagents well before adding to plate.

SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

A. Preparation of Serum Samples

- Allow the blood to clot for at least 30 minutes before centrifugation for 10 minutes at 1000g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^\circ\text{C}$.
- Avoid multiple >2 freeze/thaw cycles.
- When using frozen samples, it is recommended to thaw the samples completely mix well by vortexing and centrifuge prior to use in the assay to remove particulates.
- Serum samples should be diluted 1:2 in the Assay Buffer provided in the kit. For example, in a tube, 50 μL of serum may be combined with 50 μL of Assay Buffer. When further dilution beyond 1:2 is required, use Assay Buffer as the diluent.

B. Preparation of Plasma Samples

- Plasma collection using EDTA as an anti-coagulant is recommended.
- Centrifuge for 10 minutes at 1000g within 30 minutes of blood collection. Remove plasma and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^\circ\text{C}$.
- Avoid multiple >2 freeze/thaw cycles.
- When using frozen samples, it is recommended to thaw the samples completely mix well by vortexing and centrifuge prior to use in the assay to remove particulates.
- Plasma samples should be diluted 1:2 in the Assay Buffer provided in the kit. For example, in a tube, 50 μL of serum may be combined with 50 μL of Assay Buffer. When further dilution beyond 1:2 is required, use Assay Buffer as the diluent.

C. Preparation of Tissue Culture Supernatant

- Centrifuge the sample to remove debris and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^\circ\text{C}$.
- Avoid multiple >2 freeze/thaw cycles.
- Tissue culture supernatant may require a dilution with an appropriate control medium prior to assay. Tissue/cell extracts should be done in neutral buffers containing reagents and conditions that do not interfere with assay performance. Excess concentrations of detergent, salt, denaturants, high or low pH, etc. will negatively affect the assay. Organic solvents should be avoided. The tissue/cell extract samples should be free of particles such as cells or tissue debris.

SAMPLE COLLECTION AND STORAGE (continued)

NOTE:

- A maximum of 25 μL per well of 1:2 diluted serum or plasma can be used. Tissue culture or other media may also be used.
- All samples must be stored in polypropylene tubes. **DO NOT STORE SAMPLES IN GLASS.**
- Avoid debris, lipids and cells when using samples with gross hemolysis or lipemia.
- Care must be taken when using heparin as an anticoagulant since an excess of heparin will produce falsely high values. Use no more than 10 IU heparin per mL of blood collected.

PREPARATION OF REAGENTS FOR IMMUNOASSAY

A. Preparation of Antibody-Immobilized Beads

If premixed beads are used, sonicate the premixed bead bottle 30 seconds and then vortex for 1 minute before use.

For individual vials of beads, sonicate each antibody-bead vial for 30 seconds; vortex for 1 minute. Add 60 μL from each antibody bead vial to the Mixing Bottle and bring final volume to 3.0 mL with Bead Diluent. Vortex the mixed beads well. Unused portion may be stored at 2-8°C for up to one month. (Note: Due to the composition of magnetic beads, you may notice a slight color in the bead solution. This does not affect the performance of the beads or the kit.)

Example 1: When using 13 antibody-immobilized beads, add 60 μL from each of the 13 bead vials to the Mixing Bottle. Then add 2.22 mL Bead Diluent.

Example 2: When using 27 antibody-immobilized beads, add 60 μL from each of the 27 bead vials to the Mixing Bottle. Then add 1.38 mL Bead Diluent.

B. Preparation of Quality Controls

Before use, reconstitute Quality Control 1 and Quality Control 2 with 250 μL deionized water. Invert the vial several times to mix and vortex. Allow the vial to sit for 5-10 minutes. Unused portion may be stored at $\leq 20^\circ\text{C}$ for up to one month.

C. Preparation of Wash Buffer

Bring the 10X Wash Buffer to room temperature and mix to bring all salts into solution. Dilute 60 mL of 10X Wash Buffer with 540 mL deionized water. Store unused portion at 2-8°C for up to one month.

D. Preparation of Serum Matrix

This step is required for serum or plasma samples only.

Add 1.0 mL deionized water to the bottle containing lyophilized Serum Matrix. Mix well. Allow at least 10 minutes for complete reconstitution. Leftover reconstituted Serum Matrix should be stored at $\leq 20^\circ\text{C}$ for up to one month.

PREPARATION OF REAGENTS FOR IMMUNOASSAY (continued)

E. Preparation of Rat Cytokine / Chemokine Standard

- 1) Prior to use, reconstitute the Rat Cytokine / Chemokine Standard with 250 μL deionized water (refer to table below for analyte concentrations). Invert the vial several times to mix. Vortex the vial for 10 seconds. Allow the vial to sit for 5-10 minutes. This will be used as Standard 7; the unused portion may be stored at $\leq 20^\circ\text{C}$ for up to one month.
- 2) Preparation of Working Standards

Label 6 polypropylene microfuge tubes Standard 1 through Standard 6. Add 120 μL of Assay Buffer to each of the 6 tubes. Prepare serial dilutions by adding 40 μL of the reconstituted Standard 7 to the Standard 6 tube, mix well and transfer 40 μL of Standard 6 to the Standard 5 tube, mix well and transfer 40 μL of Standard 5 to the Standard 4 tube, mix well and transfer 40 μL of Standard 4 to the Standard 3 tube, mix well and transfer 40 μL of Standard 3 to the Standard 2 tube, mix well and transfer 40 μL of Standard 2 to the Standard 1 tube and mix well. The 0 ng/mL standard (Background) will be Assay Buffer.

Standard Tube #	Volume of Deionized Water to Add	Volume of Standard to Add
Standard 7	250 μL	0

Standard Tube #	Volume of Assay Buffer to Add	Volume of Standard to Add
Standard 6	120 μL	40 μL of Standard 7
Standard 5	120 μL	40 μL of Standard 6
Standard 4	120 μL	40 μL of Standard 5
Standard 3	120 μL	40 μL of Standard 4
Standard 2	120 μL	40 μL of Standard 3
Standard 1	120 μL	40 μL of Standard 2

Preparation of Standards



RECYTMAG-65K Rev. 15-MAY-2017

PAGE 10

END Milipore

RECYTMAG-65K Rev. 15-MAY-2017

PAGE 11

END Milipore

PREPARATION OF REAGENTS FOR IMMUNOASSAY (continued)

Standard	EGF (pg/mL)	MIP-1 α , IL-1 β , IP-10, Fractalkine, TNF α (pg/mL)
Standard 1	0.2	2.4
Standard 2	1.0	9.6
Standard 3	3.0	39.1
Standard 4	15.6	156.3
Standard 5	62.5	625.0
Standard 6	250.0	2,500.0
Standard 7	1,000.0	10,000.0

Standard	G-CSF, Eotaxin, IL-4, IL-13, IL-5, VEGF, RANTES (pg/mL)	IL-1 α , IL-17A, IL-17F (pg/mL)	GM-CSF, IL-1 α , IL-2, IL-12p70, IL-18 (pg/mL)
Standard 1	4.8	7.3	12.2
Standard 2	19.5	29.3	48.8
Standard 3	78.1	117.2	195.3
Standard 4	312.5	468.8	781.3
Standard 5	1,250.0	1,875.0	3,125.0
Standard 6	5,000.0	7,500.0	12,500.0
Standard 7	20,000.0	30,000.0	50,000.0

Standard	Leptin, IFN γ , GRO/KC/CINC-1 (pg/mL)	LIX, MIP-2 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	MCP-1 (pg/mL)
Standard 1	14.6	24.4	73.2	29.3
Standard 2	58.6	97.7	293.0	117.2
Standard 3	234.4	390.6	1,171.9	468.8
Standard 4	937.5	1,562.5	4,687.5	1,875.0
Standard 5	3,750.0	6,250.0	18,750.0	7,500.0
Standard 6	15,000.0	25,000.0	75,000.0	30,000.0
Standard 7	60,000.0	100,000.0	300,000.0	120,000.0

IMMUNOASSAY PROCEDURE

- Prior to beginning this assay, it is imperative to read this protocol completely and to thoroughly understand the Technical Guidelines.
 - Allow all reagents to warm to room temperature (20-25°C) before use in the assay.
 - Diagram the placement of Standards [0 (Background), Standards 1 through 7], Controls 1 and 2, and Samples on Well Map Worksheet in a vertical configuration. (Note: Most instruments will only read the 96-well plate vertically by default.) It is recommended to run the assay in duplicate.
 - If using a filter plate, seal the filter plate on a plate holder at all times during reagent dispensing and incubation steps so that the bottom of the plate does not touch any surface.
1. Add 200 μL of Assay Buffer into each well of the plate. Seal and mix on a plate shaker for 10 minutes at room temperature (20-25°C).
 2. Decant Assay Buffer and remove the residual amount from all wells by inverting the plate and tapping it smartly onto absorbent towels several times.
 3. Add 25 μL of each Standard or Control into the appropriate wells. Assay Buffer should be used for 0 ng/mL standard (Background).
 4. Add 25 μL of Assay Buffer to the sample wells.
 5. Add 25 μL of appropriate matrix solution to the background, standards, and control wells. When assaying serum or plasma, use the Serum Matrix. When assaying tissue culture or other supernatant, use proper control culture medium as the matrix solution.
 6. Add 25 μL of Sample (1:2 diluted) into the appropriate wells.
 7. Vortex Mixing Bottle and add 25 μL of the Mixed or Premixed Beads to each well. (Note: During addition of Beads, shake bead bottle intermittently to avoid settling.)
 8. Seal the plate with a plate sealer. Wrap the plate with foil and incubate with agitation on a plate shaker 2 hours at room temperature (20-25°C).

Add 200 μL Assay Buffer per well

Shake 10 min, RT
Decant

- Add 25 μL Standard or Control to appropriate wells
- Add 25 μL Assay Buffer to background and sample wells
- Add 25 μL appropriate matrix solution to background, standards, and control wells
- Add 25 μL 1:2 diluted Samples to sample wells
- Add 25 μL Beads in each well

Incubate 2 hours at RT

RECYTMAG-65K Rev. 15-MAY-2017

PAGE 12

END Milipore

RECYTMAG-65K Rev. 15-MAY-2017

PAGE 13

END Milipore

9. Gently remove well contents and wash plate 2 times following instructions listed in the **PLATE WASHING** section.

10. Add 25 μ L of Detection Antibodies into each well. (Note: Allow the Detection Antibodies to warm to room temperature prior to addition.)

11. Seal, cover with foil and incubate with agitation on a plate shaker for 1 hour at room temperature (20-25°C). **DO NOT ASPIRATE AFTER INCUBATION.**

12. Add 25 μ L Streptavidin-Phycoerythrin to each well containing the 25 μ L of Detection Antibodies.

13. Seal, cover with foil and incubate with agitation on a plate shaker for 30 minutes at room temperature (20-25°C).

14. Gently remove well contents and wash plate 2 times following instructions listed in the **PLATE WASHING** section.

15. Add 125 μ L of Sheath Fluid (or Drive Fluid if using MAGPIX®) to all wells. Resuspend the beads on a plate shaker for 5 minutes.

16. Run plate on Luminex® 200™, HTS, FLEXMAP 3D™ or MAGPIX® with xPONENT® software.

17. Save and analyze the Median Fluorescent Intensity (MFI) data using a 5-parameter logistic or spline curve-fitting method for calculating analyte concentrations in samples. (Note: For diluted samples, multiply the calculated concentration by the dilution factor.)

Remove well contents and wash 2X with 200 μ L Wash Buffer.

Add 25 μ L Detection Antibodies per well.

Incubate 1 hour at RT
Do Not Aspirate

Add 25 μ L Streptavidin-Phycoerythrin per well.

Incubate for 30 minutes at RT
Remove well contents and wash 2X with 200 μ L Wash Buffer.

Add 125 μ L Sheath Fluid or Drive Fluid per well.

Read on Luminex® (100 μ L, 50 beads per bead set).

PLATE WASHING

1. Solid Plate

If using a solid plate, use either a handheld magnet or magnetic plate washer.

A.) Handheld magnet (EMD Millipore Catalog # 40-285). Rest plate on magnet for 60 seconds to allow complete settling of magnetic beads. Remove well contents by gently decanting the plate in an appropriate waste receptacle and gently tapping on absorbent pads to remove residual liquid. Wash plate with 200 μ L of Wash Buffer by removing plate from magnet, adding Wash Buffer, shaking for 30 seconds, reattaching to magnet, letting beads settle for 60 seconds and removing well contents as previously described after each wash. Repeat wash steps as recommended in Assay Procedure.

B.) Magnetic plate washer (EMD Millipore Catalog # 40-094, # 40-095, # 40-098 and # 40-097). Please refer to specific automatic plate washer manual for appropriate equipment settings. Please note that after the final aspiration, there will be approximately 25 μ L of residual wash buffer in each well. This is expected when using the BioTek plate washer and this volume does not need to be aspirated from the plate.

If using an automatic plate washer other than BioTek® 405 LS or 405 TS, please refer to the manufacturer's recommendations for programming instructions.

2. Filter Plate (EMD Millipore Catalog # MX-PLATE)

If using a filter plate, use a vacuum filtration manifold to remove well contents. Wash plate with 200 μ L well of Wash Buffer, removing Wash Buffer by vacuum filtration after each wash. Repeat wash steps as recommended in the Assay Procedure.

EQUIPMENT SETTINGS

Luminex® 200™, HTS, FLEXMAP 3D® and MAGPIX® with xPONENT® software.

These specifications are for the Luminex® 200™, Luminex® HTS, Luminex® FLEXMAP 3D®, and Luminex® MAGPIX® with xPONENT® software. Luminex® instruments with other software (e.g. MasterFlex® StarStation, iLiquiChip, Bio Plex Manager™, iLUMIScan™ 100) would need to follow instrument instructions for gate settings and additional specifications from the vendors for reading Luminex® magnetic beads.

For magnetic bead assays, the Luminex® 200™ and HTS instruments must be calibrated with the xPONENT® 3.1 compatible Calibration Kit (EMD Millipore Catalog # 40-275) and performance verified with the Performance Verification Kit (EMD Millipore Catalog # 40-276). The Luminex® FLEXMAP 3D® instrument must be calibrated with the FLEXMAP 3D® Calibrator Kit (EMD Millipore Catalog # 40-028) and performance verified with the FLEXMAP 3D® Performance Verification Kit (EMD Millipore Catalog # 40-029). The Luminex® MAGPIX® instrument must be calibrated with the MAGPIX® Calibration Kit (EMD Millipore Catalog # 40-043) and performance verified with the MAGPIX® Performance Verification Kit (EMD Millipore Catalog # 40-050).

NOTE: When setting up a Protocol using the xPONENT® software, you must select MagPlex as the Bead Type in the Acquisition settings.

NOTE: These assays cannot be run on any instruments using Luminex® IS 2.3 or Luminex® 1.7 software.

LAMPIRAN G

PENYERTAAN PERSIDANGAN

P33

THE EFFECTIVENESS OF HONEY ON *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION: A SYSTEMATIC REVIEW

Quraishiah Adam¹, Fazalda Annuar¹, Alfizah Hanafiah², Nur Azlina Mohd Fahami¹

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

²Department of Medical Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia.

Aims: The annihilation of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is gradually more challenging as resistances to several antibiotics treatment have developed, thus justifying a deeper research on alternative treatment from natural sources. Therefore, this review explores the beneficial effects of honey on *H. pylori*-induced gastric ulcer.

Methods: A systematic research of the effectiveness of honey on *H. pylori* infection using electronic databases including Cvid & Medline, Scopus and EBSCOhost, was performed. The articles from the year 2000 to 2018 reporting the mechanisms and effects of honey on gastric ulcer caused by *H. pylori* infection were assessed and chosen.

Results: A total of 73 articles were identified, and nine articles of honey and its extracts were selected and assessed accordingly in this review. All the studies reported beneficial effects of honey on *H. pylori*-induced gastric ulcer. All selected honey at various concentrations showed inhibition of *H. pylori* with the minimal concentration of 10%. Honey at higher concentrations will achieve the maximal inhibition of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and activator protein 1 (AP-1). Most of the selected honey extracts by diethyl ether solvent produced high inhibition diameters of *H. pylori*.

Conclusion: The findings highlighted the potential of honey in inhibiting the *H. pylori* infection *in-vitro*. Future extensive studies should be conducted to identify the active components and molecular mechanism of honey on animal and human observational studies to deliver a valid conclusion.



**MALAYSIAN SOCIETY
OF PHARMACOLOGY
AND PHYSIOLOGY
(MSPP)**



**UNIVERSITI
KEBANGSAAN
MALAYSIA**
*National University
of Malaysia*

Certificate of Participation

This is to certify that

QURAISSIAH ADAM

has successfully participated as poster presenter in

32nd MSPP SCIENTIFIC MEETING

"TRANSLATING MEDICAL SCIENCE INTO SUSTAINABLE HEALTH CARE"

8-9 AUGUST 2018

BANGI PUTRAJAYA HOTEL, SELANGOR

Co-organised By

**MALAYSIAN SOCIETY OF PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY
PHYSIOLOGY DEPARTMENT, UKM Medical Centre
PHARMACOLOGY DEPARTMENT, UKM Medical Centre**

Prof. Dr. Nafeeza Mohd. Ismail
President
Malaysian Society of
Pharmacology and Physiology

Prof. Dr. Norfilza Mohd. Mokhtar
Organising Chairperson
32nd MSPP Scientific Meeting

LAMPIRAN H

PEMBUKTIAN PENERBITAN I

Sains Malaysiana 49(2) (2020): 191-200
<http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2020-4901-20>

In vitro Study of Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Honey: A Systematic Review (Kajian *In vitro* Aktiviti Anti-*Helicobacter pylori* Madu: Ulasan Sistematik)

ADAM QURBAISAWI, ANNUAR FAZALDA, HANAFIAH ALFIZAH & MOHD FAHAMI NUR AZLINA*

ABSTRACT

This review explores the beneficial effects of honey on Helicobacter pylori-induced gastric and duodenal ulcer. The research of the effectiveness of honey on H. pylori infection using electronic databases was done, these include Medline via Ovid Medline, Scopus and ScienceDirect published from the year 2000 to 2018. The articles were evaluated and selected based on the criteria which report on the effects of honey on gastric and duodenal ulcer caused by H. pylori infection. There are 65 articles were identified, which stated in the studies that relate to the previously stated disease. Afterwards, nine articles on honey and its extracts were selected and assessed accordingly in this review. All studies reported positive effects of honey on H. pylori-induced gastric and duodenal ulcer. Most of the study showed at minimum 10% of honey concentration were effective as anti H. pylori activity. This systematic review emphasized the potential of honey used to inhibit the H. pylori infection in human. Future extensive studies are required to find the active component and molecular mechanism of honey before clinical and human observational studies could be conducted to deliver valid evidence.

Keywords: Duodenal ulcer; gastric cancer; gastric ulcer; gastritis; *Helicobacter pylori*; honey

ABSTRAK

Ulasan ini adalah untuk mengkaji kesan manfaat madu pada Helicobacter pylori teraruh ulser gastrik dan duodenal. Satu kajian terhadap keberkesanan madu pada jangkitan H. pylori menggunakan pangkalan data elektronik telah dilakukan, ini termasuklah Medline melalui Ovid Medline, Scopus dan ScienceDirect yang telah diterbitkan dari tahun 2000-2018. Artikel telah dinilai dan dipilih berdasarkan kriteria yang melaporkan mekanisme dan kesan madu pada ulser gastrik dan duodenal yang disebabkan oleh jangkitan H. pylori. Terkumpul 65 artikel telah dikenal pasti yang merujuk kepada kajian yang sepadan dengan kriteria yang dinyatakan sebelumnya. Seterusnya, sembilan artikel mengenai madu dan ekstrak madu telah dipilih dan dinilai sewajarnya dalam kajian ini. Semua kajian melaporkan kesan positif pada madu terhadap H. pylori yang berpunca daripada ulser gastrik dan duodenal. Kebanyakan kajian menunjukkan bahawa ekstrak karungaya kepekatan madu sebanyak 10% berkesan sebagai aktiviti anti-H. pylori. Kajian sistematik ini menekankan potensi madu yang digunakan untuk merawat jangkitan H. pylori secara in-vitro. Kajian menyeluruh pada masa akan datang adalah perlu untuk mencari komponen aktif dan mekanisme molekul yang ada pada madu sebelum kajian pengamatan terhadap manusia dan manusia dilakukan untuk memberi bukti yang sah.

Kata kunci: Gastritis; *Helicobacter pylori*; kanser gastrik; madu; ulser duodenal; ulser gastrik

INTRODUCTION

Helicobacter pylori can be defined as a type of bacterium that is classified as gram-negative, flagellated, spiral-shaped and it produces large amounts of urease enzyme that neutralizes the pH inside the bacterial cells. *H. pylori* colonize within the gastrointestinal tract and mucosa layer of the stomach lining which causes inflammation and ulcers in the stomach or duodenum (Cui et al. 2012; De Monte et al. 2015; Eusebi et al. 2014). Chronic infections with *H. pylori* can lead to chronic gastritis, peptic ulcers, gastric cancer and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Although *H. pylori* infection prevalence had decreased, this bacterium still infects 30% to 50% of the general population (Altman et al. 2008; Malnick et al. 2014). In addition, patients with the severe gastroduodenal disease will have a high rate of *H. pylori* infection (Alfizah et al. 2010). Finding a good treatment for *H. pylori* infection has

always been a very challenging course. The first-line regimen to destroy *H. pylori* comprises of a triple therapy which consists of a combination of two of the standard antibiotics (clarithromycin and amoxicillin or metronidazole) plus a proton pump inhibitor (Mallertbeiner et al. 2002). However, the effectiveness of the standard triple therapy has their limitation, due to the rise in the occurrence of antibiotic resistance *H. pylori* and the noncompliance of patients to treatment routine due to the side effects of the drugs (Alfizah et al. 2014; Gisbert & Calvet 2012; Kanizaj & Kuncic 2014).

On the other hand, a lot of *in-vitro* studies on honey have shown positive activities against *H. pylori* infection (Manyi (Loh et al. 2013; Matongo & Nwodo 2014; Ruckriemen et al. 2017). Honey has been used as a food product and traditional medicine for thousands of years to cure a variety of illness because of its healing properties

LAMPIRAN I

PEMBUKTIAN PENERBITAN II

Hindawi
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2018, Article ID 7515692, 12 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/7515692>



Review Article

Antiulcer Effect of Honey in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induced Gastric Ulcer Model in Rats: A Systematic Review

Annur Fazalda, Adam Quraisiah, and Mohd Fahami Nur Azlina

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

Correspondence should be addressed to Mohd Fahami Nur Azlina; murazlina@umk.edu.my

Received 24 April 2018; Accepted 19 June 2018; Published 18 July 2018

Academic Editor: Ella Ranzani

Copyright © 2018 Annur Fazalda 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.

Background. Peptic ulcer is a basic term for ulcers on the lower esophagus, stomach, or jejunum. The specific term for ulcer in the stomach is gastric ulcer. The extensive use of honey around the globe helps researchers to study the usefulness of honey. Many studies had already been conducted and proved the effectiveness of honey in treating gastric ulcer. **Methods.** A systematic review of the literature was conducted to identify relevant studies on honey used as an alternative treatment of gastric ulcer caused by NSAIDs. A comprehensive search was conducted in Medline, SCOPUS, and Embase. The main criteria used were articles published in English and using NSAIDs-induced gastric ulcer in rats model and those reporting the effectiveness of honey. **Results.** Articles published between 2007 and 2018 were identified to be relevant to studies related to the inclusion criteria. The literature search found 30 potential and double-checked articles in this review but only 3 articles were taken which meet the criteria needed to be fulfilled. **Conclusions.** All studies in this review reported the efficacy of honey in gastric ulcer based on its antioxidant and cytoprotective activities. Most of the studies conducted used different types of honey at various doses on rats. Future studies should be conducted to identify the appropriate dose for humans to achieve similar gastroprotective effects.

1. Introduction

Peptic ulcer disease (PUD) is a disease associated with secondary damage caused by secretion of pepsin and stomach acid. The most commonly organs affected by that secretion are the stomach and proximal duodenum. Lower esophagus, distal duodenum, and jejunum are also affected but less common. About 500,000 patients are reported suffering from PUD every year in the United States alone. It often occurs in patients aged between 25 and 64 years, which is 70% of the cases, costing up to \$10 billion a year for treating PUD alone [1]. Since centuries ago, PUD was surgically controlled and caused high morbidity and mortality rates. Until the 1980s, the introduction of histamine H_2 -receptor antagonists (H_2 RA) (e.g., cimetidine and ranitidine) led to a decrease in surgery due to PUD by 85% [2].

Specifically, ulcer in stomach refers to gastric ulcer. The most frequent site of ulcer in the stomach is the lesser curvature; however, it can also occur anywhere from pylorus to cardia [3]. Factors such as the environment (cigarettes, alcohol use, and infectious agents), pain killers such as

NSAIDs, and life-giving episodes or stress [4] are among the factors that may cause gastric ulcer to patients. In terms of major pathophysiology, prostaglandins (PGs), changes in gastric mucosal barrier and blood flow, and degenerative gastric secretion are contributor to gastric ulcers [5, 6].

Alcohol consumption and cigarette smoking are closely related and become a factor causing chronic inflammation in the stomach. Furthermore, *Helicobacter pylori* (*H. Pylori*) infection is common among alcoholics. Prolonged use of alcohol is also associated with the presence of gastric metaplasia. Disruption of mucous blood flow [7] and angiogenesis and suppression of cell proliferation causes delay in ulcer healing in cigarette smokers [8].

The finding of severe damage to the surface of epithelial cells and sometime until submucosa are found in stress induced gastric ulceration. Antioxidant enzymes in the rat gastric mucosa cause an increase in histamine and pepsin but decrease in gastric fluid with the progress of ulceration (ulcer index) [9].

Under normal circumstances, the stomach is able to withstand highly concentrated hydrochloric acid, reflux bile

LAMPIRAN J

PEMBUKTIAN PENERBITAN III

Drug Design, Development and Therapy

Dovepress



ORIGINAL RESEARCH

The Skeletal Effects of Short-Term Triple Therapy in a Rat Model of Gastric Ulcer Induced by *Helicobacter pylori* Infection

This article was published in the following Dove Press journal:
Drug Design, Development and Therapy

Sophia Ogechi Ekeuku¹
Benjamin Ka Seng Thong¹
Adam Quraisiah¹
Fazalda Annuar¹
Alfifah Hanafiah¹
Mohd Faham Nur Azlina¹
Kok-Yong Chin¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Cheras, Malaysia; ²Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, People's Republic of China; ³Department of Medical Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Cheras, Malaysia

Purpose: Triple therapy is the standard therapy to eradicate *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection. Chronic use of proton pump inhibitors (PPIs), a component of triple therapy, is associated with osteoporosis. However, the skeletal effects of short-term triple therapy containing PPI remain elusive. This study aims to determine the skeletal effect of short-term triple therapy in a rat model of gastric ulcer induced by *H. pylori*.

Methods: Nine-month-old male Sprague-Dawley rats were assigned to normal control, *H. pylori*-infected group (negative control) and *H. pylori*-infected group receiving triple therapy (consisting of amoxicillin (1.0 g/kg body weight (bw)), amoxicillin (102.80 mg/kg bw) and clarithromycin (5.0 g/kg bw) (a-treatment). *H. pylori* infection developed for four weeks after inoculation, followed by two-week triple therapy. At the end of the treatment period, femoral bones of the rats were harvested for analysis. Bone mineral density and content of the femora were determined using dual-energy X-ray absorptiometry, while bone strength was assessed using a universal mechanical tester.

Results: Bone mineral content was significantly lower in the negative control group compared to the a-treatment group ($p < 0.01$). Triple therapy decreased strain (vs negative control, $p = 0.02$) and displacement of the femur (vs normal control, $p = 0.004$; vs untreated control, $p = 0.005$). No significant difference was observed in other parameters among the study groups ($p > 0.05$).

Conclusions: Short-term triple therapy increases bone mineral content but decreases bone strength of rats. Skeletal prophylaxis should be considered for patients on short-term triple therapy containing PPI.

Keywords: bone, gastric ulcer, osteoporosis, osteopenia, proton pump inhibitors

Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a type of Gram-negative bacteria known to cause peptic ulcer disease and gastric cancer.¹ *H. pylori* infection is also associated with extra-gastrointestinal diseases, such as metabolic syndrome, cardiovascular diseases and neurodegenerative diseases due to alteration in the immune system and low-grade inflammation.² Since bone cells are sensitive to pro-inflammatory cytokines,³ chronic *H. pylori* infection could predispose a person to bone loss and osteoporosis. The relationship between *H. pylori* infection and bone health in humans has been contradictory so far. A recent meta-analysis showed that *H. pylori* increases the risk of osteoporosis [odds ratio (OR) 1.61, 95% confidence interval (CI) 1.31–2.32] but is not associated with significant variation in bone mineral density.⁴ The limited

Correspondence: Kok-Yong Chin
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Level 17, Preclinical Building Jalan Macao, 43000, Bandar Tun Razak, Cheras 56000, Kuala Lumpur, Malaysia
Tel +60 3-9145-9673
Email chin.koyong@ppk.um.kl.my

Drug Design, Development and Therapy 2020:14 5359–5366

5359

© 2020 Chin et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <http://www.dovepress.com/terms-and-conditions>. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or by any information storage or retrieval system, without prior written permission from Dove Medical Press Limited, the copyright holder. For more information, please contact the permissions@dovepress.com journal administrator.