

Kesan Polifenol Minyak Kelapa Dara ke atas Aktiviti Enzim Antioksidan dan Lipid Peroksida Pada Sel Osteoblas

(Virgin Coconut Oil Polyphenol Effects on Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation on Osteoblast Cell)

ZIL HAYATULLINA, NORAZLINA MOHAMED, IMA-NIRWANA SOELAIMAN & NORLIZA MUHAMMAD*

ABSTRAK

Osteoporosis dikaitkan dengan radikal bebas dan tekanan oksidatif. Kandungan polifenol yang tinggi dalam minyak kelapa dara (VCO) yang bertindak sebagai antioksidan mampu menghalang tekanan oksidatif seterusnya mencegah osteoporosis. Uji kaji in vitro ini dijalankan untuk mengkaji mekanisme kesan perlindungan polifenol ekstrak daripada VCO (PF) ke atas sel selanjara pre-osteoblas mencit (MC3T3-E1) teraruh tekanan oksidatif. Untuk mengkaji viabiliti kesan perlindungan polifenol terhadap MC3T3-E1 daripada toksisiti hidrogen peroksida (H_2O_2), sel MC3T3-E1 dirawat dengan beberapa dos polifenol selama 24 jam selepas dieram dengan $250 \mu M$ (IC_{50}) H_2O_2 selama 1 jam. Mekanisme perlindungan dikaji dengan mengukur aras malondialdehid (MDA) serta aktiviti enzim antioksidan iaitu superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx) dan katalase (CAT). Keputusan kajian menunjukkan bahawa kepekatan perencatan median (IC_{50}) H_2O_2 pada 1 jam adalah $250 \mu M$. Ujian viabiliti sel mendapati kesemua dos polifenol dapat melindungi sel MC3T3-E1 daripada toksisiti H_2O_2 . Dos 1 dan $0.01 \mu M$ polifenol dapat meningkatkan aras GPx dan CAT, manakala dos 0.01 dan $0.0001 \mu M$ dapat meningkatkan aras SOD. Sementara itu, hanya dos 0.01 dan $0.001 \mu M$ sahaja yang dapat menghalang peningkatan aras MDA. Kesimpulan yang dapat dibuat di dalam kajian ini adalah polifenol daripada minyak kelapa dara mencegah lipid peroksida pada sel MC3T3-E1 yang telah diaruh dengan H_2O_2 dengan meningkatkan aktiviti enzim antioksidan.

Kata kunci: Osteoporosis; polifenol; sel MC3T3-E1; tekanan oksidatif; VCO

ABSTRACT

Osteoporosis is associated with free radicals and oxidative stress. The high polyphenol contents in virgin coconut oil (VCO) can prevent oxidative stress and consequently osteoporosis. This in vitro study was conducted in order to determine the mechanism of the protective effects of polyphenol extracted from VCO on murine osteoblast-like cell line (MC3T3-E1) which was induced with oxidative stress. To study the protective effects on viability of MC3T3-E1 cells exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2) toxicity, MC3T3-E1 cells were post-treated with different doses of polyphenol for 24 h after 1 h incubation with $250 \mu M$ of H_2O_2 (IC_{50}). The protective mechanism was studied by measuring malondialdehyde (MDA) levels as well as antioxidant enzymes activities which are superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT). The results showed that the median inhibitory concentration (IC_{50}) for H_2O_2 after 1 h was $250 \mu M$. Cell viability tests showed that all the doses of polyphenol were able to protect MC3T3-E1 cells from H_2O_2 toxicity. The dose of 1 and $0.01 \mu M$ of polyphenol increased the level of GPx and CAT while the dose of 0.01 and $0.0001 \mu M$ increased the level of SOD. Meanwhile, the $0.0001 \mu M$ of PF prevented the MDA elevation. In conclusion, the polyphenol components in virgin coconut oil prevent lipid peroxidation in MC3T3-E1 cells induced with H_2O_2 by increasing the endogenous antioxidant enzymes.

Keywords: MC3T3-E1 cells; osteoporosis; oxidative stress; polyphenol; VCO

PENGENALAN

Osteoporosis ialah sejenis penyakit metabolik tulang yang bercirikan pengurangan jisim tulang dan gangguan mikroarkitektur pada tulang. Hal ini menyebabkan kekuatan dan ketumpatan tulang semakin berkurang, lalu menjerus kepada kepatahan tulang (Daroszewska 2015). Osteoporosis dikenali sebagai penyakit yang senyap kerana ia tidak memberikan masalah kepada penderitanya sehinggalah kepatahan tulang berlaku (Cosman et al. 2014). Masalah osteoporosis semakin menular dalam kalangan masyarakat terutamanya kepada wanita

pascamenopaus seiring dengan pertambahan jangka hayat dan umur populasi penduduk dunia. Selepas seseorang wanita mengalami menopaus, hormon estrogen semakin berkurang dan ini menyebabkan aktiviti osteoklastik di dalam tulang melebihi aktiviti osteoblastik (Norliza et al. 2012). Apabila keadaan ini berlaku, seseorang wanita itu perlu berhati-hati kerana tulang menjadi semakin rapuh dan risiko mendapat kepatahan tulang adalah tinggi (McNamara 2010).

Selain daripada penurunan fungsi endokrin dalam kalangan wanita pascamenopaus, beberapa faktor

lain seperti nutrisi, genetik serta faktor fizikal juga memainkan peranan yang penting di dalam patogenesis osteoporosis. Di samping itu, osteoporosis juga dikaitkan dengan tekanan oksidatif, iaitu keadaan di mana terdapat kerosakan pada sel terutamanya kepada komponen membran sel, protein dan lipid akibat aktiviti radikal bebas yang melampau (Danielle et al. 2015). Kajian terdahulu mendapati tekanan oksidatif mempengaruhi fungsi dan aktiviti kedua-dua jenis sel tulang yang penting iaitu osteoblas dan osteoklas, terutamanya dalam meningkatkan pembezaan dan mengaktifkan fungsi osteoklas lalu menjurus kepada kehilangan jisim tulang (Baek et al. 2010). Aktiviti radikal bebas yang berlebihan menyebabkan penurunan aras antioksidan dan ketumpatan mineral tulang (BMD) terutamanya kepada lelaki yang berusia serta wanita yang telah mencapai status menopause (Altindag et al. 2008; Sendur et al. 2009). Kajian juga mendapati kekurangan antioksidan seperti vitamin E boleh menyebabkan impak negatif kepada kesihatan tulang dan pengambilan antioksidan boleh mencegah dan merawat kehilangan jisim tulang (Muhammad et al. 2010). Fakta ini turut disokong oleh Morton et al. (2001) yang mendapati terdapat peningkatan pada nilai BMD apabila wanita pascamenopaus mengambil suplemen antioksidan jenis Vitamin C.

Minyak kelapa dara lebih istimewa daripada minyak kelapa biasa kerana mempunyai kandungan vitamin dan antioksidan yang tinggi memandangkan ia diekstrak daripada santan kelapa melalui proses penapaian tanpa melibatkan penggunaan haba (Marina et al. 2009). Beberapa kajian terdahulu menunjukkan keajaiban minyak ini dalam menghalang pembentukan sel kanser (Manisha & Shyamapada 2011) di samping sifat antiviral (Arora et al. 2011), antibakteria (Oyi et al. 2010), antikaries (Taheri et al. 2010), antiplak (Barnabe et al. 2004) dan antiprotozoa (Soskowska & Balslev, 2009). Kajian kami sebelum ini turut membuktikan kesan positif minyak kelapa dara terhadap metabolisme tulang kerana ia mencegah kehilangan jisim tulang serta meningkatkan aras antioksidan endogenous dalam tulang tikus model osteoporosis (Abujazia et al. 2012; Zil Hayatullina et al. 2012). Kandungan antioksidan jenis polifenol yang tinggi dalam minyak kelapa dara ini didapati bertanggungjawab dalam menghasilkan kesan farmakologinya (Nevin & Rajamohan 2005). Sehingga kini, hanya terdapat sebilangan kecil penyelidik yang mengkaji mekanisme cara tindak polifenol ke atas unsur biologi. Sepanjang pengetahuan kami, kajian ini adalah kajian yang pertama yang mengkaji kesan komponen fenolik minyak kelapa dara terhadap sel pembentukan tulang iaitu sel osteoblas.

BAHAN DAN KAEDAH KAJIAN

PENGKULTURAN SEL

Sampel yang digunakan adalah sel selanjara pre-osteoblas menyerupai mencit (MC3T3-E1) yang dibeli dari

American Type Culture Collection (ATCC), USA dan dikultur di dalam *Alpha Minimum Essential Medium* (α -MEM) yang mengandungi deoksiribonukleosida, 2 mL L-glutamin dan 1 mM Natrium piruvat, tetapi tidak mengandungi asid askorbik yang dibeli dari GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA). Alpha-MEM ini ditambah dengan 10% serum bovin fetal dan disuplementasi dengan antibiotik 50 unit/mL penisilin dan 50 μ g/mL streptomisin. Sel MC3T3-E1 disubkultur di dalam kelalang 75-cm² sehingga mencapai 80% konfluen dalam masa 3 hari di dalam mesin inkubator karbon dioksida (5% CO₂/95% udara) pada suhu 37°C.

PENGEKSTRAKAN POLIFENOL MINYAK KELAPA DARA (PF)

Polifenol minyak kelapa dara diekstrak berdasarkan kaedah Nevin dan Rajamohan (2004). Secara ringkasnya, 10 g VCO dilarutkan di dalam 50 mL cecair heksana. Kemudian, campuran tersebut diekstrak dengan menggunakan 60% methanol sebanyak 60 mL. Pengekstrakan dengan 60% methanol dibahagikan kepada 3 dengan 20 mL setiap 2 minit. Campuran ekstrak VCO dikeringkan dengan menggunakan mesin penyejat berputar pada suhu 40°C.

ARUHAN HIDROGEN PEROKSIDA DAN RAWATAN POLIFENOL VCO

Sebelum memulakan kajian, kesan sitotoksik H₂O₂ dan polifenol VCO terhadap viabiliti sel dibuat dengan menggunakan kit asai proliferasi sel (MTS) (Abcam). Sejumlah 1 × 10⁴ sel/cm² sel MC3T3-E1 dikultur di dalam media kultur lengkap (CCM) pada 96-telaga plat mikrotiter sehingga mencapai 80% konfluen. Beberapa siri kepekatan H₂O₂ daripada 0 sehingga 100 μ M telah ditambah ke dalam setiap telaga selama 1 jam. Untuk melihat kesan perlindungan dan rawatan polifenol minyak kelapa dara (PF) terhadap sitotoksikiti sel MC3T3-E1 aruhan H₂O₂ pula, sel MC3T3-E1 akan dieram dengan H₂O₂ berdasarkan kepekatan yang telah dipilih sebelum dirawat dengan beberapa siri kepekatan PF (0.0001 - 0.1 μ g/mL) selama 24 jam. Medium mengandungi H₂O₂ perlu dibuang terlebih dahulu sebelum rawatan PF ditambah ke dalam plat telaga. Pengukuran Aktiviti Enzim Antioksidan dan malondialdehid (MDA)

Sel MC3T3-E1 dikultur pada ketumpatan 2 × 10⁵ sel/mL di dalam CCM sehingga mencapai 70% konfluen. Kemudian, sel MC3T3-E1 itu dikultur di dalam media kultur pembezaan selama 15 hari sebelum sel didedahkan dengan aruhan H₂O₂. Media kultur pembezaan disediakan dengan mencampurkan media α -MEM dengan 10% serum bovin fetal, 1% penisilin/streptomisin, 5 mM β -gliserofosfat dan 50 μ g/mL asid askorbik. Sel MC3T3-E1 dirawat dengan PF selama 24 jam. Setelah itu, sel diambil untuk menjalani parameter aktiviti enzim antioksidan dengan menggunakan kit asai Superoksida dismutase (SOD), Glutation Peroksidase (GPx) dan Katalase (CAT) dibeli dari Cayman Chemical, USA. Kit malondialdehid (MDA) pula dibeli dari Biovision, USA.

ANALISIS STATISTIK

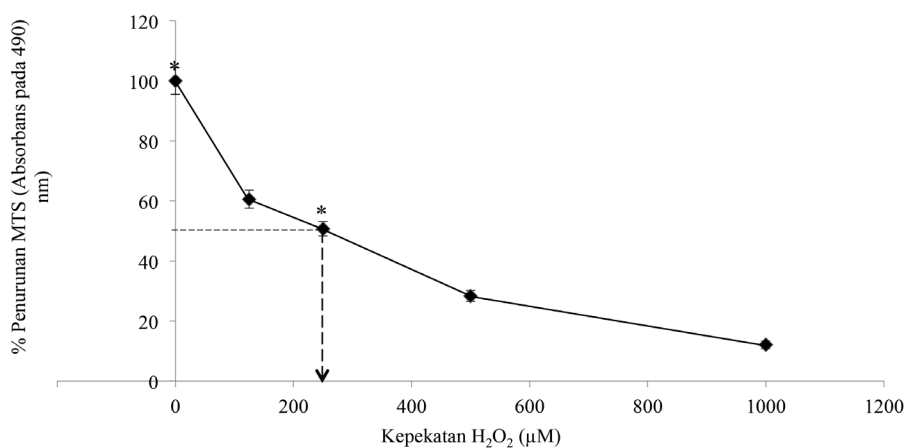
Analisis data dilakukan dengan menggunakan perisian computer 'Statistical Package for Social Sciences' (SPSS 19.0, Chicago, IL, USA). Data yang diperoleh diuji kenormalannya dengan ujian *Kolmogorov-Smirnov*. Data taburan normal dianalisis dengan menggunakan ujian parametric ANOVA dan disusuli dengan *Tukey's hsd*. Data yang bertaburan tidak normal pula dianalisis menggunakan ujian tak-parametrik *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney U*. Kesemua keputusan kajian dikemukakan dalam bentuk min \pm ralat min piawai (SEM).

KEPUTUSAN KAJIAN

Rajah 1 menunjukkan kesan sitotoksiti H_2O_2 terhadap sel selanjur pre-osteoblas mencit (MC3T3-E1) selepas rawatan selama 1 jam. Dalam kajian ini, didapati bahawa viabiliti sel MC3T3-E1 menurun apabila kepekatan

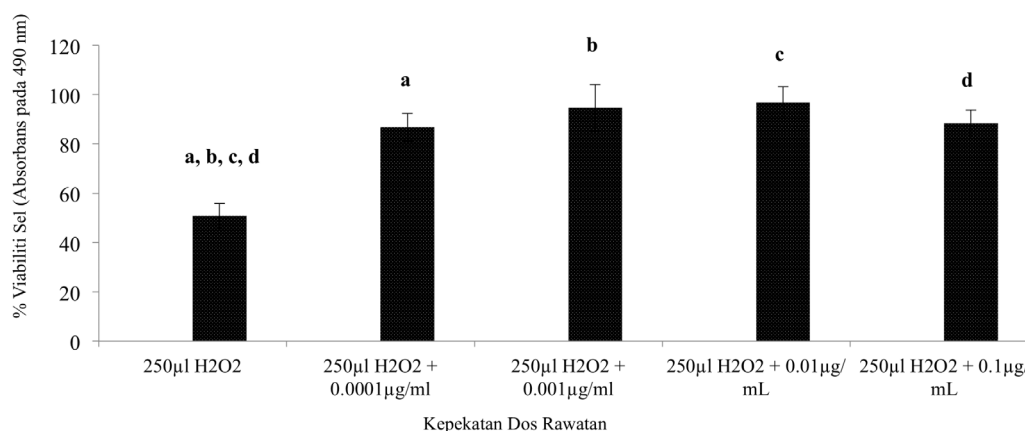
H_2O_2 meningkat. Penurunan viabiliti sel berlaku secara signifikan ($p < 0.05$) apabila sel MC3T3-E1 dirawat dengan H_2O_2 yang berkepekatan melebihi $250 \mu M$ berbanding kumpulan kawalan. Rawatan H_2O_2 yang berkepekatan melebihi $250 \mu M$ selama satu jam menurunkan viabiliti sel MC3T3-E1 melebihi 50%. Didapati bahawa IC_{50} bagi sel MC3T3-E1 yang didedahkan dengan H_2O_2 selama satu jam adalah $250 \mu M$.

Kesan rawatan polifenol yang diekstrak daripada minyak kelapa dara terhadap sel MC3T3-E1 ditunjukkan pada Rajah 2. Keputusan kajian menunjukkan kesemua dos PF iaitu 0.1, 0.01, 0.001 dan 0.0001 $\mu g/mL$ dapat meningkatkan viabiliti sel MC3T3-E1 secara signifikan ($p < 0.05$) setelah didedahkan pada $250 \mu M H_2O_2$ selama satu jam. Walau bagaimanapun, tiada dos PF yang menurunkan viabiliti sel MC3T3-E1 berbanding kumpulan kawalan. Oleh kerana dos PF (0.1, 0.01, 0.001 dan 0.0001 $\mu g/mL$) yang diberikan kepada sel MC3T3-E1 tidak



Symbol (*) menunjukkan bahawa nilai berbeza secara signifikan ($p < 0.05$) dengan kumpulan kawalan (kepekatan 0)

RAJAH 1. Kesan toksisiti H_2O_2 terhadap sel selanjur pre-osteoblas mencit (MC3T3-E1) ditentukan dengan menggunakan asai MTS. Sel MC3T3-E1 didedahkan dengan H_2O_2 selama 1 jam. Didapati IC_{50} bagi 1 jam adalah $250 \mu M$



Kumpulan yang mempunyai abjad yang sama menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$)

RAJAH 2. Graf kesan toksisiti polifenol minyak kelapa dara terhadap sel MC3T3-E1 yang ditentukan dengan menggunakan asai MTS. Sel MC3T3-E1 didedahkan dengan $250 \mu M H_2O_2$ selama 1 jam sebelum dirawat dengan kepekatan polifenol selama 24 jam

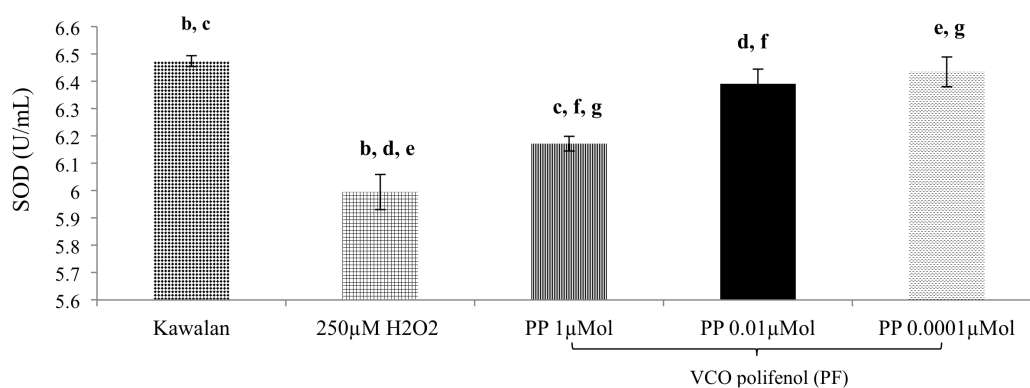
menunjukkan kesan toksik, tiga dos telah dipilih untuk digunakan di dalam kajian seterusnya. Dos yang dipilih adalah dos 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sebagai dos pertengahan dan 0.0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sebagai dos rendah PF. Dos PF pada kepekatan 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pula dipilih sebagai dos tinggi adalah berdasarkan nisbah kepekatan yang telah dikira.

Kesan H_2O_2 dan PF terhadap enzim superoksida dismutase (SOD) pada sel MC3T3-E1 ditunjukkan pada Rajah 3. Keputusan kajian menunjukkan dedahan sel MC3T3-E1 pada kepekatan 250 μM H_2O_2 selama 1 jam menurunkan aktiviti SOD secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan dan kumpulan PF. Walau bagaimanapun, selepas diberi rawatan polifenol selama 24 jam pada kepekatan 0.01 dan 0.0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dapat meningkatkan aktiviti SOD secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan H_2O_2 sahaja. Didapati juga bahawa pos-rawatan polifenol kepada sel MC3T3-E1 dapat meningkatkan aktiviti SOD setara dengan kumpulan kawalan.

Kesan H_2O_2 dan rawatan PF terhadap aktiviti enzim glutation peroksidase (GPx) pada sel MC3T3-E1

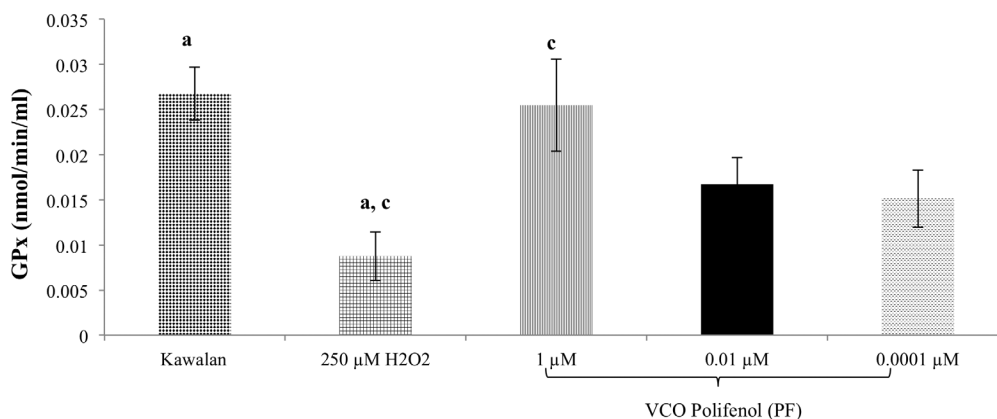
ditunjukkan pada Rajah 4. Keputusan kajian menunjukkan dedahan sel MC3T3-E1 pada kepekatan 250 μM H_2O_2 selama 1 jam menurunkan aktiviti GPx secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan dan kumpulan polifenol berkepekatan 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Selain peningkatan secara signifikan ($p < 0.05$) aktiviti GPx pada kumpulan 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PF berbanding kumpulan 250 μM H_2O_2 , peningkatan kumpulan 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PF juga setara dengan kumpulan kawalan.

Kesan H_2O_2 dan rawatan PF terhadap enzim katalase (CAT) pada sel MC3T3-E1 ditunjukkan pada Rajah 5. Keputusan kajian menunjukkan dedahan sel MC3T3-E1 pada kepekatan 250 μM H_2O_2 selama 1 jam menurunkan aktiviti CAT secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan dan kumpulan PF. Walau bagaimanapun, selepas diberi rawatan polifenol selama 24 jam pada kepekatan 1 dan 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dapat meningkatkan aktiviti CAT secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan H_2O_2 sahaja. Didapati juga bahawa pos-rawatan polifenol kepada sel MC3T3-E1 dapat meningkatkan aktiviti CAT setara dengan kumpulan kawalan.



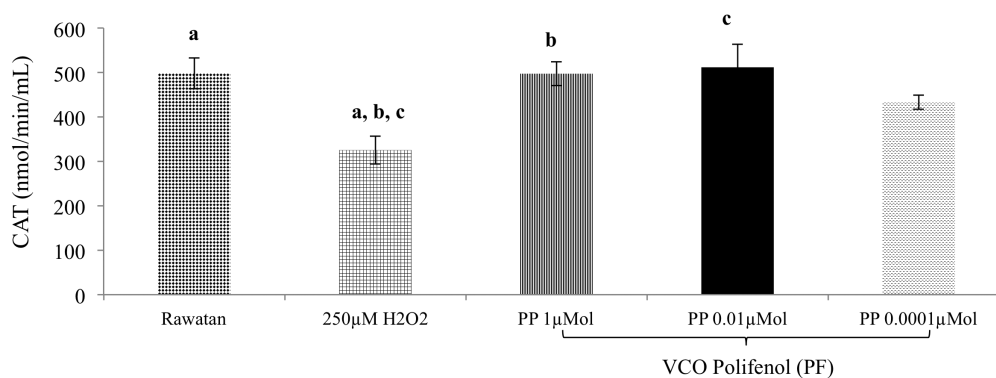
Kumpulan yang mempunyai abjad yang sama menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$).

RAJAH 3. Kesan H_2O_2 dan PF terhadap aktiviti SOD di dalam sel MC3T3-E1. Sel MC3T3-E1 didedahkan dengan 250 μM H_2O_2 selama 1 jam sebelum dirawat dengan PF berkepekatan 1, 0.01 dan 0.0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selama 24 jam



Kumpulan yang mempunyai abjad yang sama menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$)

RAJAH 4. Kesan H_2O_2 dan PF terhadap aktiviti GPx di dalam sel MC3T3-E1. Sel MC3T3-E1 didedahkan dengan 250 μM H_2O_2 selama 1 jam sebelum dirawat dengan PF berkepekatan 1, 0.01 dan 0.0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selama 24 jam



Kumpulan yang mempunyai abjad yang sama menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$)

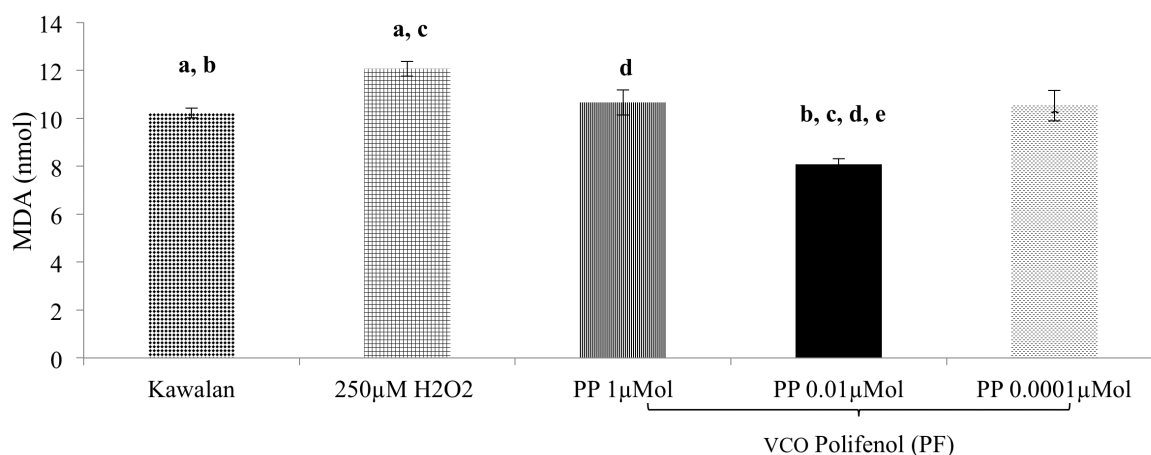
RAJAH 5. Kesan H₂O₂ dan PF terhadap aktiviti CAT di dalam sel MC3T3-E1. Sel MC3T3-E1 didedahkan dengan 250 µM H₂O₂ selama 1 jam sebelum dirawat dengan PF berkepekatan 1, 0.01 dan 0.0001 µg/mL selama 24 jam

Kesan H₂O₂ dan rawatan polifenol yang diekstrak daripada minyak kelapa dara terhadap aras MDA pada sel MC3T3-E1 ditunjukkan pada Rajah 6. Keputusan kajian menunjukkan dedahan sel MC3T3-E1 pada kepekatan 250 µM H₂O₂ selama 1 jam meningkatkan aras MDA secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan kawalan dan kumpulan 0.01 µg/mL PF. Walau bagaimanapun, selepas diberi rawatan PF selama 24 jam pada kepekatan 0.01 µg/mL dapat menurunkan aras MDA secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kumpulan H₂O₂ sahaja, kumpulan kawalan dan kumpulan 1 µg/mL PF. Didapati juga bahawa pos-rawatan polifenol kepada sel MC3T3-E1 dapat meningkatkan aras MDA setara dengan kumpulan kawalan.

PERBINCANGAN

Dalam kajian ini, hidrogen peroksida (H₂O₂) digunakan sebagai bahan toksik untuk memberi aruhan tekanan oksidatif kepada sel MC3T3-E1. H₂O₂ terhasil daripada pelbagai proses di dalam badan termasuklah tindak balas

dismutasi anion superoksida (O₂⁻) yang terhasil daripada proses respirasi mitokondria, sama ada secara spontan atau ditukarkan oleh enzim superoksida dismutase. Keputusan kajian mendapati H₂O₂ pada kepekatan yang tinggi, iaitu melebihi 250 µM mempunyai kesan toksik dan menjejaskan viabiliti sel MC3T3-E1 setelah didedahkan selama 1 jam. Kajian ini selari dengan kajian Xu et al. (2011), yang mendapati bahawa sel selanjut menyerupai osteoblas menciit (MC3T3-E1) mengalami kecederaan maut setelah didedahkan dengan dos tinggi H₂O₂ (400-800 µM) selama 4 hingga 6 jam, manakala dos yang rendah pula (0-200 µM) tidak menjejaskan viabiliti sel ini. Zhang et al. (2012) juga mendapati bahawa H₂O₂ berkepekatan tinggi (0.3 mM) merangsang tekanan oksidatif dan menyebabkan kematian sel MC3T3-E1. Di samping itu, kajian oleh Nizar et al. (2012) juga menunjukkan kepekatan dos H₂O₂ melebihi 200 µM menjejaskan viabiliti sel. Terjajarnya viabiliti sel MC3T3-E1 berikutan terdedah kepada H₂O₂ adalah bergantung kepada bersandaran-dos (Linares et al. 2009)



Kumpulan yang mempunyai abjad yang sama menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$)

RAJAH 6. Kesan H₂O₂ dan PF terhadap aras MDA di dalam sel MC3T3-E1. Sel MC3T3-E1 didedahkan dengan 250 µM H₂O₂ selama 1 jam sebelum dirawat dengan PF berkepekatan 1, 0.01 dan 0.0001 µg/mL selama 24 jam

dan bersandaran-dos dan bersandaran-masa (Park et al. 2005; Xu et al. 2011).

Dalam kajian ini, sel MC3T3-E1 dibezakan dahulu selama 15 hari sebelum didedahkan kepada H_2O_2 . Osteoblast atau sel menyerupai osteoblast didapati lebih cenderung mengalami apoptosis selepas proses pembezaan, dengan meningkatkan aras fragmentasi DNA dan ekspresi gen pro-apoptotik seperti Bcl-2 (Pereira et al. 2001; Zalavras et al. 2003). Kajian Fatokun et al. (2008) menunjukkan sel MC3T3-E1 yang mengalami pembezaan lebih sensitif kepada H_2O_2 berbanding sel yang belum membeza. Ini juga berlaku pada jenis sel lain seperti dalam kajian Chodimella et al. (2005) yang menunjukkan sel selanjur neuronal (NSC34D) yang mengalami pembezaan sepenuhnya lebih sensitif kepada nitrik oksida berbanding sel yang tidak membeza sepenuhnya.

Selepas dieram dengan H_2O_2 selama 1 jam, sel MC3T3-E1 mengalami kematian sebanyak 50%. Kajian ini selari dengan kajian dibuat oleh Lee et al. (2001) yang menunjukkan viabiliti sel MC3T3-E1 menurun secara signifikan selepas didedahkan pada H_2O_2 dan $FeSO_4$ selama 24 jam, tetapi meningkat setelah rawatan genistein diberikan selama 6 jam kemudian. Kajian yang dibuat oleh Park et al. (2003) pula menunjukkan rawatan awal polifenol teh hijau (GTPP) pada dos 200 $\mu M/mL$ selama 1 jam pada sel osteoblast dapat mengurangkan kesan toksisiti pada sel yang didedahkan dengan 50 dan 100 $mmol/L$ H_2O_2 selama 24 jam berbanding kumpulan sel kawalan (H_2O_2 sahaja). Kajian ini telah disokong oleh Hagiwara et al. (2011) yang mendapati hidroksitirosoil iaitu polifenol daripada minyak zaitun meningkatkan viabiliti sel MC3T3-E1 sebanyak 60% setelah menerima aruhan H_2O_2 . Keadaan ini dapat dijelaskan bahawa sel-sel yang masih hidup akan berproliferasi semula dan rawatan PF ke atas sel dapat mempercepatkan lagi proses proliferasi tersebut. Ini menunjukkan polifenol yang diekstrak daripada minyak kelapa dara sangat aktif dan memberi rawatan secara signifikan kepada sel yang mengalami tekanan oksidatif. Walau bagaimanapun kajian ini agak berbeza dengan kajian terdahulu apabila rawatan PF pada sel diberi selepas sel didedahkan pada tekanan oksidatif, sebaliknya kajian terdahulu telah memberi rawatan kepada sel terlebih dahulu sebelum didedahkan kepada tekanan oksidatif. Melalui kaedah ini, dapat disimpulkan bahawa PF yang diekstrak daripada minyak kelapa dara bukan sahaja memberi perlindungan kepada tulang tetapi juga dapat merawat kerosakan pada tulang dengan membantu meningkatkan proses selular proliferasi pada sel osteoblast.

Ketidakseimbangan antara osteoblast dan osteoklas disebabkan oleh peningkatan resorpsi tulang melebihi pembentukan tulang, menyebabkan terjadinya penyakit degenerasi tulang termasuk osteoporosis. Banyak kajian telah membuktikan bahawa tekanan oksidatif yang tinggi mempengaruhi terjadinya osteoporosis, disebabkan oleh proses penuaan dan defisiensi estrogen (Baek et al. 2010; Maggio et al. 2003). Tekanan oksidatif terhasil daripada spesies oksigen reaktif (ROS) yang berlebihan,

boleh menyebabkan kerosakan dan kemusnahan kepada pelbagai jenis tisu. Hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan sumber utama spesies oksigen reaktif (ROS) yang seringkali digunakan sebagai penjana ROS di dalam model tekanan oksidatif *in vitro* (Satoh et al. 1996). Disebabkan oleh H_2O_2 mempunyai separa-hidup yang panjang dan berkebolehan untuk masuk ke dalam membran biologi, ia mempunyai ciri yang bersesuaian yang bertindak ke atas isyarat luar (intra) dan dalam (inter) selular (Denisova et al. 2001).

Penghasilan radikal bebas boleh mengganggu mekanisme pertahanan antioksidan. Kajian ini menunjukkan sel MC3T3-E1 yang dieram selama 1 jam dengan 250 μM H_2O_2 mengalami penurunan aktiviti SOD, GPx dan CAT secara signifikan berbanding kumpulan kawalan. Kajian ini selari dengan kajian Kamat et al. (2000) yang mendapati bahawa H_2O_2 secara signifikan menurunkan aktiviti SOD, GPx dan CAT. Kajian yang dilakukan oleh Nizar et al. (2012) pula menunjukkan pendedahan sel osteoblast pada 490 μM H_2O_2 selama 2 jam telah menurunkan aktiviti SOD, GPx dan CAT secara signifikan berbanding kumpulan kawalan. Kajian lain juga mendapati pendedahan sel selanjur menyerupai mencit (MC3T3-E1) pada kepekatan 400 μM H_2O_2 juga menurunkan aktiviti SOD (Xu et al. 2011). Kajian ini selari dengan beberapa kajian yang telah mengaitkan kesan buruk H_2O_2 terhadap enzim antioksidan endogenus. Antaranya adalah kajian yang dibuat oleh Wang et al. (2010) mendapati bahawa rawatan 400 μM H_2O_2 selama 12 jam pada sel HUVEC menurunkan aktiviti GPx sebanyak 52.76%. Wu et al. (2006) pula mendapati pendedahan 150 μM H_2O_2 selama 1 jam ke atas sel selanjur feokromositoma (PC12) telah menurunkan aktiviti enzim glutation peroksidase (GPx), superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT) berbanding kumpulan kawalan negatif.

Kajian ini menunjukkan rawatan PF daripada VCO membantu meningkatkan mekanisme pertahanan aktiviti enzim antioksidan daripada spesies oksigen reaktif (ROS) dan menghalang peroksidasi lipid. Meningkatnya aktiviti enzim antioksidan menandakan kurangnya pembentukan radikal hidroksil (OH^\cdot). Kajian *in vivo* oleh Nevin dan Rajamohan (2006) menunjukkan tikus yang diberi VCO meningkatkan aras SOD, GPx dan CAT berbanding minyak kopra dan minyak kacang tanah.

MDA merupakan produk akhir proses peroksidasi lipid dan selalu digunakan untuk mengukur aras peroksidasi lipid. Secara umumnya, peroksidasi lipid adalah proses pro-oksidan seperti radikal bebas atau spesies bukan radikal penyerang lipid mengandungi ikatan dua karbon, terutamanya asid lemak politaktepu (PUFAs), yang melibatkan keluarnya atom hidrogen daripada rantaian karbon PUFA. Radikal lipid yang terbentuk kemudian bercantum dengan oksigen membentuk radikal lipid peroksil dan hidroperoksid (Yin et al. 2011). Kajian ini selari dengan kajian Zhang et al. (2012) yang mendapati rawatan H_2O_2 pada kepekatan 0.3 mM selama 24 jam telah meningkatkan aras MDA secara signifikan. Kajian Rupesh

et al. (2008) pula menunjukkan peningkatan aras MDA pada sel selanjur kulit fibroblas (AH927) setelah dieram dengan 0.5 mM H₂O₂ selama 24 jam. Kajian *in vivo* menunjukkan bahawa paras peroksidasi lipid (MDA) meningkat dalam homogenat tisu femur tikus yang diovariectomi (Nadia et al. 2014).

Dalam kajian ini, PF minyak kelapa dara telah menunjukkan kesan positif apabila PF dapat menurunkan aras MDA selepas aruhan H₂O₂. Ini bertepatan dengan kajian Scalbert et al. (2005) yang menyatakan bahawa aktiviti antioksidan polifenol adalah melalui tindakan hidroksil fenolik yang mudah mendermakan atom hidrogen (H) kepada radikal peroksid lipid (FAOO), lalu menghasilkan spesies lipid yang lebih stabil. Apabila atom H telah didermakan, polifenol menjadi radikal bebas yang secara relatifnya tidak reaktif kerana elektron tidak berpasangan menjadikan ia tidak setempat ke dalam gelang aromatik. Kajian ini selari dengan kajian Nevin dan Rajamohan (2006) yang menunjukkan tikus yang diberi PF daripada VCO berjaya menghalang pembentukan peroksidasi lipid. Kajian *in vivo* yang dibuat oleh Abujazia et al. (2012) menunjukkan suplementasi minyak kelapa dara menurunkan aras MDA pada tikus yang telah diovariectomi. Minyak kelapa dara juga menurunkan aras MDA pada tikus berkolesterol tinggi (Nevin & Rajamohan 2008). Selain itu, minyak kelapa dara menurunkan aras MDA pada tikus yang telah diberi rawatan alkohol (Dosumu et al. 2010).

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat dibuat dalam kajian ini adalah polifenol daripada minyak kelapa dara (PF) merupakan antioksidan yang aktif, berpotensi untuk meningkatkan kadar enzim antioksidan dan menurunkan lipid peroksida pada sel MC3T3-E1 yang telah diaruh dengan H₂O₂. Oleh kerana tiada dos yang menjadi toksik kepada sel MC3T3-E1, polifenol VCO juga sesuai dijadikan rawatan sampingan untuk merawat dan menghalang osteoporosis pascamenopaus daripada berlaku.

PENGHARGAAN

Setinggi-tinggi penghargaan buat pihak UKM yang telah memberikan dana bagi penyelidikan ini serta semua kakitangan Jabatan Farmakologi terutamanya Encik Fadhlullah Zuhair, Puan Juliana Abdul Hamid, Puan Nurul Hafizah Abas dan Puan Farhana Mohd Fauzi atas bantuan teknikal semasa kajian ini dijalankan.

RUJUKAN

- Abujazia, M.A., Norliza, M., Ahmad, N.S. & Ima Nirwana, S. 2012. The effects of virgin coconut oil on bone oxidative status in ovariectomized rats. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2012: 525079. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/525079>.
- Altindag, O., Erel, O., Soran, N., Celik, H. & Selek, S. 2008. Total oxidative/antioxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatology International* 28(4): 317-321.

- Arora, R., Chawla, R., Marwah, R., Arora, P., Sharma, R.K., Kaushik, V., Goel, R., Kaur, A., Silambarasan, M., Tripathi, R.P. & J.R. Bhardwaj. 2011. Potential of complementary and alternative medicine in preventive management of novel H1N1 flu (Swine flu) pandemic: Thwarting potential disasters in the Bud. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2011: 586506. doi:10.1155/2011/586506.
- Baek, K.H., Oh, K.W., Lee, W.Y., Lee, S.S., Kim, M.K., Kwon, H.S., Rhee, E.J., Han J.H., Song, K.H. & Cha, B.Y. 2010. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcified Tissue International* 87(3): 226-235.
- Barnabé, W., de Mendonça Neto, T., Pimenta, F.C., Pegoraro, L.F. & Scolaro, J.M. 2004. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Journal of Oral Rehabilitation* 31(5): 453-459.
- Chodimella, R., Anderson, J., Hong, Y. & Bishop, A. 2005. *Nitric Oxide (NO) Sensitivity and Differentiation Status in Motor Neurons (Abstract)*. Washington, DC: Society for Neuroscience.
- Cosman, F., de Beur, S.J., LeBoff, M.S., Lewiecki, E.M., Tanner, B., Randall, S. & Lindsay, R. 2014. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis International* 25(10): 2359-2381.
- Danielle, A.C. & Jiang, J.X. 2015. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 33(4): 359-370.
- Daroszevska, A. 2015. Prevention and treatment of osteoporosis in women: An update. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 25(7): 181-187.
- Denisova, N.A., Cantuti-Castelvetri, I., Hassan, W.N., Paulson, K.E. & Joseph, J.A. 2001. Role of membrane lipids in regulation of vulnerability to oxidative stress in PC12 cells: implication for aging. *Free Radical Biology and Medicine* 30(6): 671-678.
- Dosumu, O.O., Duru, F.I.O., Osinuba, A.A., Oremosu, A.A. & Noronha, C.C. 2010. Influence of virgin coconut oil (VCNO) on oxidative stress, serum testosterone and gonadotropic hormones (FSH, LH) in chronic ethanol ingestion. *Agriculture & Biology Journal of North America* 1(6): 1126-1132.
- Fatokun, A.A., Stone, T.W. & Smith, R.A. 2008. Responses of differentiated MC3T3-E1 osteoblastic cells to reactive oxygen species. *European Journal of Pharmacology* 587(1-3): 35-41.
- Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H. & Hagiwara, H. 2011. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European Journal of Pharmacology* 662(1-3): 78-84.
- Kamat, J.P., Bloor, K.K., Devasagayam, T.P.A. & Venkatachalam, S.R. 2000. Antioxidant properties of asparagus racemosus against damage induced by gamma-radiation in rat liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology* 71(3): 425-435.
- Lee, Y.S., Chen, X. & Anderson, J.J.B. 2001. Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Nutrition Research* 21(9): 1287-1298.
- Linares, G.R., Xing, W., Govoni, K.E., Chen, S. & Mohan, S. 2009. Glutaredoxin 5 regulates osteoblast apoptosis by protecting against oxidative stress. *Bone* 44(5): 795-804.

- Maggio, D., Barabani, M., Pierandrei, M., Polidori, M.C., Catani, M., Mecocci, P., Senin, U., Pacifici, R. & Cherubini, A. 2003. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(4): 1523-1527.
- Manisha, D. & Shyamapada, M. 2011. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4(3): 241-247.
- Marina, A.M., Che Man, Y.B. & Nazimah, A.H. 2009. Chemical properties of virgin coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86(4): 301-307.
- McNamara, L.M. 2010. Perspective on post-menopausal osteoporosis: Establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures. *Journal of the Royal Society Interface* 7(44): 353-372.
- Morton, D.J., Barrett-Connor, E.L. & Schneider, D.L. 2001. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of Bone Mineral Research* 16(1): 135-140.
- Muhammad, Z.M., Ahmad, N.S., Norazlina, M., Norliza, M. & Ima-Nirwana, S. 2010. Beneficial effects of vitamin E isomer supplementation on static and dynamic bone histomorphometry parameters in normal male rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 28(5): 503-509.
- Nadia, M.E. & Ahmad, N.S. 2014. Time and dose-dependent effects of *Labisia pumila* on bone oxidative status of postmenopausal osteoporosis rat model. *Nutrients* 6(8): 3288-3302.
- Nevin, K.G. & Rajamohan, T. 2006. Virgin coconut oil supplemented diet increased the antioxidant status in rats. *Food Chemistry* 99(2): 260-266.
- Nevin, K.G. & Rajamohan, T. 2008. Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed Sprague-Dawley rats. *European Journal of Clinical Nutrition Metabolism* 3: 1-8.
- Nevin, K.G. & Rajamohan, T. 2005. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. *Food Chemistry* 99(2): 260-266.
- Nevin, K.G. & Rajamohan, T. 2004. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and *in vitro* LDL oxidation. *Clinical Biochemistry* 37(9): 830-835.
- Nizar, A.M., Norazlina, M. & Ahmad, N.S. 2012. Effects of low-dose versus high doses γ -tocotrienol on the bone cells exposed to the hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2012: 680834. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/680834>.
- Norliza, M., Douglas, A.L., Ahmad, N.S., Norazlina, M. & Ima-Nirwana, S. 2012. Two different isomers of vitamin E prevent bone loss in postmenopausal osteoporosis rat model. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2012: 161527. <https://doi.org/10.1155/2012/161527>.
- Oyi, A.R., Onaolapo, J.A. & Obi, R.C. 2010. Formulation and antimicrobial studies of coconut (*Cocos nucifera* Linne) oil. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology* 2(2): 133-137.
- Park, B.G., Yoo, C.I., Kim, H.T., Kwon, C.H. & Kim, Y.K. 2005. Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells. *Toxicology* 215(1-2): 115-125.
- Park, Y.H., Wan, D.W., Suh, H., Ryu, G.H., Hyon, S.H., Cho, B.K. & Park, J.C. 2003. Protective effects of green tea polyphenol against reactive oxygen species-induced oxidative stress in cultures rat calvarial osteoblast. *Cell Biology & Toxicology* 19(5): 325-337.
- Pereira, R.M., Delany, A.M. & Canalis, E. 2001. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 28(5): 484-490.
- Rupesh, D., Chitrangada, A., Bindu, P.C. & Kundu, S.C. 2008. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMP Reports* 41(3): 236-241.
- Satoh, I., Sakai, N., Enokido, Y., Uchiyama, Y. & Hatanaka, H. 1996. Free radical independent protection by nerve growth factor and Bcl-2 of PC12 cells from hydrogen peroxide-triggered apoptosis. *Journal of Biochemistry* 120: 540-546.
- Scalbert, A., Johnson, I.T. & Saltmarsh, M. 2005. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition* 81(1): 215S-217S.
- Sendur, O.F., Turan, Y., Tastaban, E. & Serter, M. 2009. Antioxidant status in patients with osteoporosis: A controlled study. *Joint Bone Spine* 76(5): 514-518.
- Sosnowska, J. & Balslev, H. 2009. American palm ethnomedicine: A metaanalysis. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 5: 43. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-5-43>.
- Taheri, J.B., Espineli, F.W., Lu, H., Asayesh, M., Bakshi, M. & Nakhostin, M.R. 2010. Antimicrobial effect of coconut flour on oral microflora: An *in vitro* study. *Research Journal of Biological Sciences* 5(6): 456-459.
- Wang, Y.K., Hong, Y.J., Wei, M., Wu, Y., Huang, Z.Q., Chen, R.Z. & Chen, H.Z. 2010. Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂. *Journal of Ethnopharmacology* 132(1): 233-239.
- Wu, J.H., Xu, C., Shan, C.Y. & Tan, R.X. 2006. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *Chinensis*. *Life Science* 78(6): 622-630.
- Xu, Z.S., Wang, X.Y., Xiao, D.M., Hu, L.F., Lu, M., Wu, Z.Y. & Bian, J.S. 2011. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage - implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radical Biology & Medicine* 50(10): 1314-1323.
- Yin, H., Xu, L. & Porter, N.A. 2011. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews* 111(10): 5944-5972.
- Zalavras, C., Shah, S., Birnbaum, M.J. & Frenkel, B. 2003. Role of apoptosis in glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 13(2-4): 221-235.
- Zhang, J.K., Yang, L., Meng, G.L., Fang, J., Chen, J.Z., He, Q.Z., Chen, S., Fan, J.Z., Luo, Z.J. & Liu, J. 2012. Protective effects of tetrahydroxystilbene glucoside against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cell. *European Journal of Pharmacology* 689: 31-37.
- Zil Hayatullina, Norliza, M., Norazlina, M. & Ima-Nirwana, S. 2012. Virgin coconut oil supplementation prevents bone loss in osteoporosis rat model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 237236.

50300 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan
Malaysia

Diserahkan: 3 April 2018

Diterima: 5 Jun 2018

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: norliza_ssp@ppukm.
ukm.edu.my