

Kesan Apigenin, Berberin dan Rutin terhadap Metabolisme Kolesterol pada Sel Kanser Hep G2

(Effect of Apigenin, Berberine and Rutin on Cholesterol Metabolism in Hep G2 Cancer Cell)

MOHD KAMAL NIK HASSAN*, RASADAH MAT ALI, ZULKHAIRI HJ. AMOM, MOHD SHAHIDAN MOHD ARSHAD, ZAMREE MD SHAH, KHAIRUL KAMILAH ABDUL KADIR & IHSAN SAFWAN KAMARAZAMAN

ABSTRAK

Dalam kajian ini, keupayaan Apigenin, Berberin dan Rutin untuk mengurangkan metabolisme kolesterol pada sel kanser hepatoma manusia (Hep G2) telah ditentukan. Penilaian sitotoksik Apigenin, Berberin dan Rutin telah dilakukan dengan mendedahkan Hep G2 kepada Apigenin, Berberin dan Rutin pada kepekatan antara 7.8 sehingga 1000 µg/mL selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% atmosfera CO₂. Apigenin, Berberin dan Rutin masing-masing mempunyai kepekatan perencat 20 (IC₂₀) 7.8, 125 dan 1000 µg/mL. Keupayaan mengurangkan metabolisme kolesterol oleh Apigenin, Berberin dan Rutin pada Hep G2 telah diuji dengan penyediaan Hep G2 dalam plat 6-telaga. Kumpulan rawatan Apigenin, Berberin dan Rutin telah dirawat dengan kepekatan 7.8, 31.25 dan 62.5 µg/mL masing-masing dan didedah dengan lipoprotein ketumpatan rendah (LDL) sebanyak 10 µL. Dalam kumpulan kawalan normal (NC), Hep G2 telah dieram dengan media kultur sahaja. Sel diinkubasikan dan media telah diambil untuk analisis Apo A1, LCAT, LDLR dan FDFT1 dengan menggunakan kit. Rutin didapati mampu merendahkan aktiviti HMGR secara signifikan (p<0.05) berbanding kawalan normal. Apigenin dan Berberin mampu meningkatkan kepekatan APO A1. Ketiga – tiga sampel mampu meningkatkan kepekatan LCAT pada sel yang dirawat. Selain itu, Apigenin mampu meningkatkan kepekatan LDLR. Keputusan ujian untuk FDFT1 menunjukkan Berberin dan Rutin merendahkan kepekatan FDFT1 dan berbeza secara signifikan (p<0.05) berbanding kawalan normal. Penemuan ini menunjukkan bahawa Apigenin, Berberin dan Rutin mempunyai potensi dalam mengurangkan metabolisme kolesterol dalam sel Hep G2.

Kata kunci: Apigenin; Berberin; metabolisme kolesterol; Rutin

ABSTRACT

In this study, the ability of Apigenin, Berberine and Rutin to reduce cholesterol metabolism in human hepatoma cancer cell line (Hep G2) was determined. Cytotoxic assessment of Apigenin, Berberine and Rutin were performed by exposing the Hep G2 to Apigenin, Berberine and Rutin at concentrations ranging from 7.8 to 1000 µg/mL for 24 h at 37°C and with 5% CO₂ atmosphere. The inhibition concentration 20 (IC₂₀) of Apigenin, Berberine and Rutin were 7.8, 125 and 1000 µg/mL, respectively. The ability of reducing cholesterol metabolism effects of Apigenin, Berberine and Rutin on Hep G2 was carried out by seeding the cell in 6-well plates. In the treated groups, Hep G2 was treated with Apigenin, Berberine and Rutin (7.8, 31.25 and 62.5 µg/mL, respectively) and exposed to 10 µL low density lipoprotein (LDL). In the normal control (NC) groups, Hep G2 was incubated with culture medium only. The cell was incubated and media was taken for analysis of Apo A1, LCAT, LDLR and FDFT1 by using kit. Rutin was able to lower down HMGR activity significantly (p<0.05) compared with normal control. Apigenin and Berberine were able to increase the concentration of APO A1. All the three samples can increase the concentration of LCAT in treated cells. In addition, Apigenin can increase the concentration of LDLR. The test results for FDFT1 showed that Berberin and Rutin can lower down FDFT1 concentrations and significantly different (p<0.05) compared with normal controls. These findings suggested that Apigenin, Berberine and Rutin have the potential in reducing cholesterol metabolism in Hep G2 cancer cell lines.

Keywords: Apigenin; Berberine; cholesterol metabolism; Rutin

PENGENALAN

Penyakit kardiovaskular seperti aterosklerosis didapati kian meningkat dalam kalangan penduduk Malaysia (KKM 2011). Pengambilan makanan berlebihan dan amalan gaya hidup yang tidak sihat menyumbang kepada meningkatnya jumlah pesakit kardiovaskular (McMurray & Stewart 2000). Selain itu, tekanan dalam menjalani kehidupan seharian contohnya pekerjaan yang

terlalu menekan perasaan dan kesibukan dengan urusan kerja menyebabkan individu tersebut tidak mengambil peduli terhadap tahap kesihatan mereka (Leeder et al. 2004). Aktiviti fizikal seperti bersenam yang kurang dilakukan juga merupakan faktor yang menyumbang kepada meningkatnya potensi untuk individu tersebut mendapat penyakit kardiovaskular (Colditz 1999). Penyakit kardiovaskular mempunyai kaitan yang sangat

rapat dengan pemakanan berkolesterol tinggi (Colditz 1999; Conlin 1999).

Kebelakangan ini, terdapat banyak kajian memfokuskan kepada ekstrak tumbuhan bagi mendapatkan bahan kimia yang berguna untuk meningkatkan taraf kesihatan manusia sejagat (Chia et al. 2012; Vadakkemuriyil et al. 2012). Ekstrak daripada tumbuhan seperti Apigenin, Berberin dan Rutin didapati amat berguna untuk kesihatan dan mempunyai nilai perubatan (Kulkarni & Dhir 2010; Ruela-de-Sousa et al. 2010; Susan 2005; Verma et al. 2012). Menurut kajian saintifik yang lepas, ketiga-tiga ekstrak ini mempunyai kaitan dalam pengawalan lemak dan kolesterol dalam badan manusia (Kulkarni & Dhir 2010; Ruela-de-Sousa et al. 2010; Verma et al. 2012).

Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone), flavonoid diet yang umum dan terdapat dalam jumlah yang banyak dalam buah-buahan dan sayur-sayuran (Ruela-de-Sousa et al. 2010). Di samping dikenal pasti sebagai flavonoid yang berpotensi untuk membunuh sel-sel kanser (Caltagirone et al. 2000), Apigenin juga didapati boleh merencatkan proses sintesis asid lemak (Wang et al. 1999).

Berberin adalah alkaloid tumbuhan (Imanshahidi & Hosseinzadeh 2008). Berberin juga dilaporkan banyak digunakan dalam perubatan Ayurvedic dan Cina (Kulkarni & Dhir 2010). Ge et al. (2011) menyimpulkan bahawa berberin hidroklorida mampu mengawal selia transkripsi gen hepatic yang terlibat dalam metabolisme glukosa dan asid lemak.

Rutin adalah flavonol glikosida (Nitra et al. 2004). Rutin tulen adalah hablur berwarna kuning atau kuning-hijau berbentuk jarum. Rutin terdiri daripada quersetin dan rutinose disakarida (ramnosa dan glukosa) (Nitra et al. 2004). Rutin boleh membantu untuk mencegah aterosclerosis dan mengurangkan sitotoksik kolesterol LDL-teroksida (Verma et al. 2012). Rutin juga menstabilkan vitamin C (Goulas & Manganaris 2012). Rutin boleh ditemui dalam buah-buahan citrus seperti oren, lemon dan limau (Chidambara et al. 2012), anggur (Iacopini et al. 2008), beri mulberi dan kranberi (Zhenchang et al. 2012).

Kajian ini dijalankan untuk melihat kemampuan ekstrak Apigenin, Berberin dan Rutin dalam mengawal metabolisme kolesterol pada sel hepatoma (Hep G2) secara *in vitro*. Antara enzim dan molekul yang terlibat dalam metabolisme kolesterol yang dikaji adalah HMG Co-A Reduktase (HMGR), Apolipoprotein A1 (Apo A1), Kolesterol Lesitin Asiltransferase (LCAT), Reseptor Lipoprotein Ketumpatan Rendah (LDLR) dan Farnesil-difosfat farnesiltransferase 1 (FDFT1).

BAHAN

Sebatian Apigenin, Berberin dan Rutin telah dibekalkan oleh Program Kimia, FRIM. Sel kanser Hep G2 telah dibeli dari American's Type Cell Culture (ATCC). Pravastatin, Penisilin-streptomisin, tripan biru, serum janin lembu (FBS), dimetil sulfoksida (DMSO), 3-4,5 dimetil tiazol-2, 5 difenil tetrazolium bromida (MTT) dan penimbal garam

fosfat (PBS) telah dibeli dari Sigma, Amerika Syarikat. Instrumen yang digunakan dalam kajian ini adalah inkubator CO₂ (Shelab, Jerman), hemositometer (La Fontaine, Perancis), pam vakum, pipet pelbagai saluran (RAININ, USA), pengempar (Hettich, Zentrifugen, Jerman), takung pemanas air (Jeitech, Korea), pembaca mikroplat (UVM 340, Jerman), mikroskop berbalik (Nikon Gerhana TS100) dan pengempar mikro.

KAEDAH

EKSTRAKSI SEBATIAN APIGENIN, BERBERIN DAN RUTIN

Proses ekstraksi ini dijalankan untuk mendapat sebatian yang dikehendaki. Sumber sebatian ini adalah sayuran dan beberapa jenis herba seperti Teh (*Camellia sinensis*) dan Patawali (*Tinospora crispa*). Ekstraksi sebatian Apigenin telah dijalankan mengikut kaedah Siniša et al. (2000) dengan beberapa modifikasi. Ekstraksi sebatian Berberin telah dijalankan mengikut kaedah Tsutomu et al. (1972). Manakala proses ekstraksi Rutin adalah mengikut kaedah Kyoung et al. (2005) dengan beberapa modifikasi.

KAJIAN SITOTOKSISITI: PENENTUAN IC₅₀ APIGENIN, BERBERIN DAN RUTIN

Sel telah dibenihkan dalam plat 96-telaga dalam jumlah 1 × sel 10⁴ setiap telaga. Sel telah dihidupkan dengan 100 µL media RPMI 1640 selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% atmosfera CO₂. Selepas 24 jam, sel ini telah ditambah dengan 100 µL media dan didedah kepada 100 µL Apigenin, Berberin dan Rutin dengan 10 kepekatan yang berbeza. Apigenin, Berberin dan Rutin telah disediakan 1:2 pencairan bersiri iaitu 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 µg/mL. Kemudian, sel telah diperhatikan selepas 24 jam. Pada akhir tempoh uji kaji, asai MTT telah dilakukan ke atas sel. Sebanyak 20 µL larutan MTT telah ditambah ke setiap plat telaga. Kemudian, plat diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada 37°C selama 4 jam. Selepas pengeraman, 100 µL DMSO telah ditambah kepada setiap telaga untuk melarutkan kristal ungu. Plat telah dipindahkan kepada pembaca plat dan dibaca pada 570 nm. Graf peratusan sel hidup terhadap kepekatan Apigenin, Berberin dan Rutin diplotkan dan penentuan IC₅₀ telah dilakukan. Uji kaji telah dilakukan sebanyak tiga kali. Analisis SPSS telah dilakukan untuk melihat pemerhatian sitotoksik Apigenin, Berberin dan Rutin kepada Hep G2.

$$\text{Peratus sel hidup (\%)} = \frac{\text{Penyerapan sel dirawat}}{\text{Penyerapan sel kawalan}} \times 100.$$

UJI KAJI MELIHAT KEMAMPUAN APIGENIN, BERBERIN DAN RUTIN DALAM MERENDAHKAN AKTIVITI HMGR

Ujian HMGR dilakukan mengikut kaedah seperti yang dinyatakan daripada buku panduan yang diberikan bersama kit (CS1090, Sigma). Secara ringkas, penimbal asai ditambah ke dalam kuvet. Kemudian, bagi kumpulan kawalan pravastatin, perencat (pravastatin) telah ditambah

ke dalam kuvet untuk mengawal aktiviti enzim. NADPH telah ditambah ke dalam kuvet diikuti dengan penambahan larutan substrat (HMG-CoA) ke dalam kuvet tersebut. Kemudian, HMG-CoA redaktase (HMGR) telah ditambahkan dan dicampurkan sampel (Apigenin, Berberin atau Rutin) dengan teliti. Kemudian, bacaan penyerapan telah dilakukan secara kinetik selama 5 min menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 340 nm.

PENYEDIAAN SAMPEL SEL: UJI KAJI UNTUK MELIHAT PENGARUH APIGENIN, BERBERIN DAN RUTIN DALAM MENGAWAL KEPEKATAN APO A1, LCAT, LDLR DAN FDFT1 PADA SEL HEP G2

Penyediaan sampel sel ini adalah berdasarkan kaedah Hubert et al. (2001) dan Peter et al. (2010) dengan beberapa modifikasi. Uji kaji ini telah dijalankan selepas kepekatan yang berkesan Apigenin, Berberin dan Rutin dikenal pasti. Sel dihidupkan dalam plat 6-telaga dan diinkubasi dalam CO₂ inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam atau sehingga sel meliputi lantai telaga. Uji kaji ini telah direka bentuk dengan menggunakan tiga jenis kumpulan iaitu kawalan normal, kawalan pravastatin dan kumpulan rawatan. Kawalan normal (NC) adalah sel Hep G2 dan media kultur sahaja tanpa sebarang rawatan. Kawalan pravastatin pula merupakan sel Hep G2 dan media kultur ditambah dengan 3 × 10⁻⁷M pravastatin dan 10 µL LDL, manakala kumpulan rawatan adalah sel Hep G2 dan media kultur ditambah dengan 10 µL LDL dan rawatan sampel iaitu Apigenin atau Berberin atau Rutin (masing-masing 7.82 µg/mL, 31.25 µg/mL dan 62.5). Kemudian, plat diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% atmosfera CO₂. Uji kaji telah dilakukan sebanyak tiga kali.

UJI KAJI UNTUK MELIHAT PENGARUH APIGENIN, BERBERIN DAN RUTIN DALAM MENGAWAL KEPEKATAN APO A1, LCAT, LDLR DAN FDFT1 PADA SEL HEP G2

Selepas diinkubasi selama 24 jam, media daripada plat telaga dikumpulkan. Media diambil untuk penentu ukuran enzim dan molekul yang terlibat dalam metabolisme kolesterol mengikut buku panduan yang telah diberikan bersama kit tersebut. Apolipoprotein A1 (Apo A1) telah ditentukan dengan menggunakan kit dari ELISA kit AssayMax Apolipoprotein A1, nombor katalog EA5301-1. Kolesterol Lesitin Asiltransferase (LCAT) telah ditentukan dengan menggunakan kit dari Wuhan EIAAB Science Co, LTD, nombor katalog: E98516 Hu. Reseptor Lipoprotein Ketumpatan Rendah (LDLR) telah ditentukan dengan menggunakan kit dari Wuhan EIAAB Science Co, LTD, nombor katalog: E91008Hu. Farnesil-difosfat farnesiltransferase 1 (FDFT1) telah ditentukan dengan menggunakan kit dari Wuhan EIAAB Science Co, LTD, nombor katalog: E1708h.

Langkah-langkah dalam menjalankan uji kaji tersebut diringkaskan seperti berikut. Plat mikrotiter yang terdapat dalam kit tersebut adalah pra-bersalut dengan antibodi khusus kepada molekul yang dikaji masing-masing

(Apo A1, LCAT, LDL R dan FDFT1). Sebagai contoh molekul dikaji adalah LCAT. Semasa tindak balas, LCAT dalam sampel atau piawai bersaing dengan LCAT Biotin berlabel yang beramaun tetap untuk tapak ke atas antibodi monoklonal pra-bersalut khusus untuk LCAT. Konjugat, sampel atau piawai yang berlebihan dibasuh daripada plat. Seterusnya, Avidin terkonjugat Horseradish Peroksidase (HRP) ditambah kepada setiap plat telaga mikroplat dan diinkubasi. Kemudian, satu larutan substrat TMB telah ditambah kepada setiap telaga. Tindak balas enzim-substrat telah ditamatkan dengan penambahan larutan asid sulfurik dan perubahan warna diukur pada panjang gelombang 450 ± 2 nm. Kepekatan LCAT di dalam sampel telah ditentukan dengan membandingkan OD sampel kepada lengkung piawai.

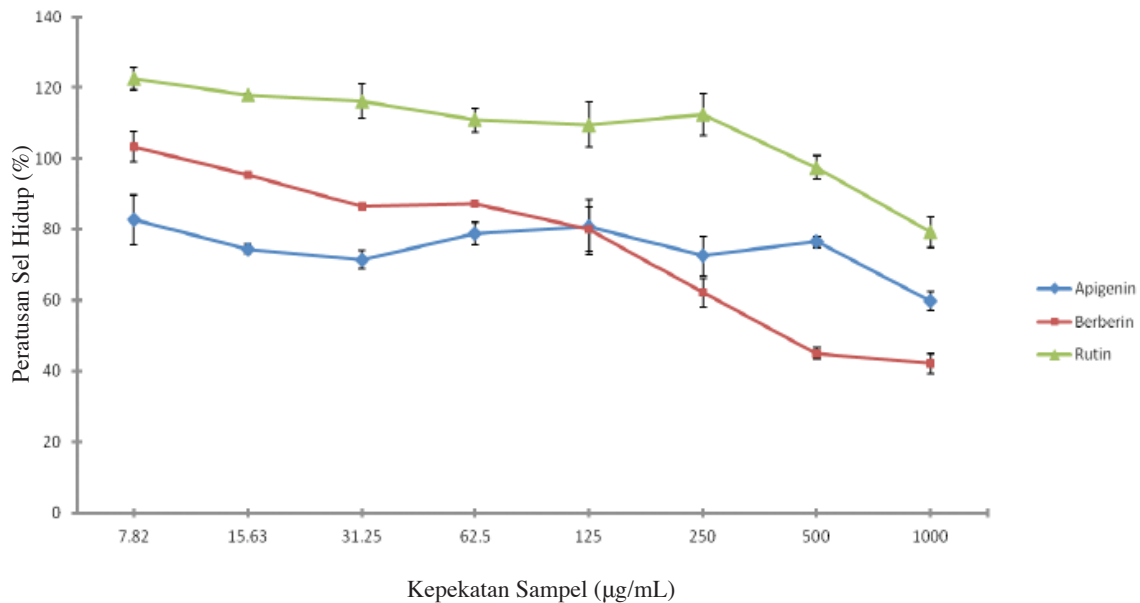
ANALISIS STATISTIK

Analisis varians (ANOVA) dan Tukey HSD telah dijalankan untuk membandingkan min antara kumpulan. Kepentingan telah diterima pada $p < 0.05$.

HASIL DAN PERBINCANGAN

KAJIAN SITOTOKSISITI: PENENTUAN IC₂₀ APIGENIN, BERBERIN DAN RUTIN

Rajah 1 menunjukkan Apigenin, Berberin dan Rutin masing-masing mempunyai kepekatan perencat 20 (IC₂₀) 7.8, 125 dan 1000 µg/mL. Dalam kajian lepas, Apigenin telah dibuktikan sebagai antikanser (Ruela-de-Sousa et al. 2010). Lien-Chai et al. (2006) melaporkan bahawa, Apigenin bertindak sebagai anti-proliferatif terhadap sel Hep G2 pada kepekatan 8.02 µg/mL selepas rawatan selama 48 jam. Bagi mengelakkan toksisiti terhadap sel Hep G2 yang menyebabkan metabolisme kolesterol terganggu disebabkan kematian sel, kepekatan Apigenin yang boleh digunakan untuk uji kaji seterusnya adalah 7.8 µg/mL. Bagi kepekatan Berberin, Diogo et al. (2011) pernah melaporkan Berberin mempunyai potensi untuk bertindak sebagai antikanser. Walau bagaimanapun, daripada Rajah 1, dapat diperhatikan Berberin tidak bertindak sebagai antiproliferatif terhadap sel Hep G2 pada kepekatan yang rendah. Oleh itu, kepekatan 31.25 µg/mL dipilih berdasarkan kajian lepas dilakukan oleh Abidi et al. (2006) yang menggunakan kepekatan yang rendah untuk mengkaji kesan Berberin terhadap Hep G2. Rajah 1 juga menunjukkan bahawa Rutin tidak toksik terhadap sel Hep G2, walaupun pada kepekatan 1000 µg/mL Rutin tidak bertindak sebagai antiproliferatif terhadap sel kanser Hep G2. Herba tumbuhan yang mengandungi Rutin dilaporkan boleh bertindak sebagai antikanser pada kepekatan yang tinggi (Hana et al. 2010). Walau bagaimanapun, Su-Tze et al. (2011) melaporkan herba *Zanthoxylum ailanthoides* yang mengandungi Rutin boleh bertindak sebagai antiproliferatif pada kepekatan 73.06 µg/mL terhadap 'Human Promyelocytic cell' (HL-60). Oleh itu, kepekatan bagi Rutin yang sesuai untuk digunakan adalah 62.5 µg/



RAJAH 1. Peratusan sel hidup di dalam plat 96-telaga terhadap kepekatan sample (Apigenin, Berberin dan Rutin). Sel Hep G2 telah dihidupkan dengan 100 µL media RPMI 1640 dalam plat 96-telaga dalam jumlah 1×10^4 sel setiap telaga. Sel telah dirawat dengan kepekatan tertentu Apigenin, Berberin dan Rutin selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% atmosfera CO₂

mL. Kepekatan ini adalah dipastikan tidak menyebabkan nekrosis pada sel yang boleh mengganggu metabolisme kolesterol pada sel Hep G2 di samping pengaruh rutin terhadap metabolisme tersebut dapat diperhatikan.

UJI KAJI UNTUK MELIHAT KEMAMPUAN APIGENIN, BERBERIN DAN RUTIN DALAM MERENDAHKAN AKTIVITI HMGR

Rajah 2 menunjukkan Apigenin dan Berberin tidak bertindak merendahkan aktiviti HMGR secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kawalan normal. Rutin boleh bertindak merendahkan aktiviti HMGR dalam sel Hep G2. Hasil ini adalah sama sepertimana dilaporkan oleh Sun-Young et al. (2002) yang menyatakan Rutin mampu menurunkan aktiviti HMGR pada tikus yang dirawat. Walau bagaimanapun, jika dibandingkan hasil ujian, Rutin adalah berbeza secara signifikan ($p < 0.05$) dengan kawalan pravastatin. HMGR adalah enzim yang sangat penting dalam penghasilan kolesterol (Olle 1996). Dalam tapak jalan mevalonate, HMGR bertindak menukarkan kolesterol kepada mevalonate. Hasil ujian ini menunjukkan Rutin hanya bertindak secara sederhana dalam merendahkan aktiviti penghasilan kolesterol (Wen et al. 1992). Manakala Apigenin dan Berberin tidak bertindak secara signifikan dalam merendahkan aktiviti penghasilan kolesterol pada sel Hep G2.

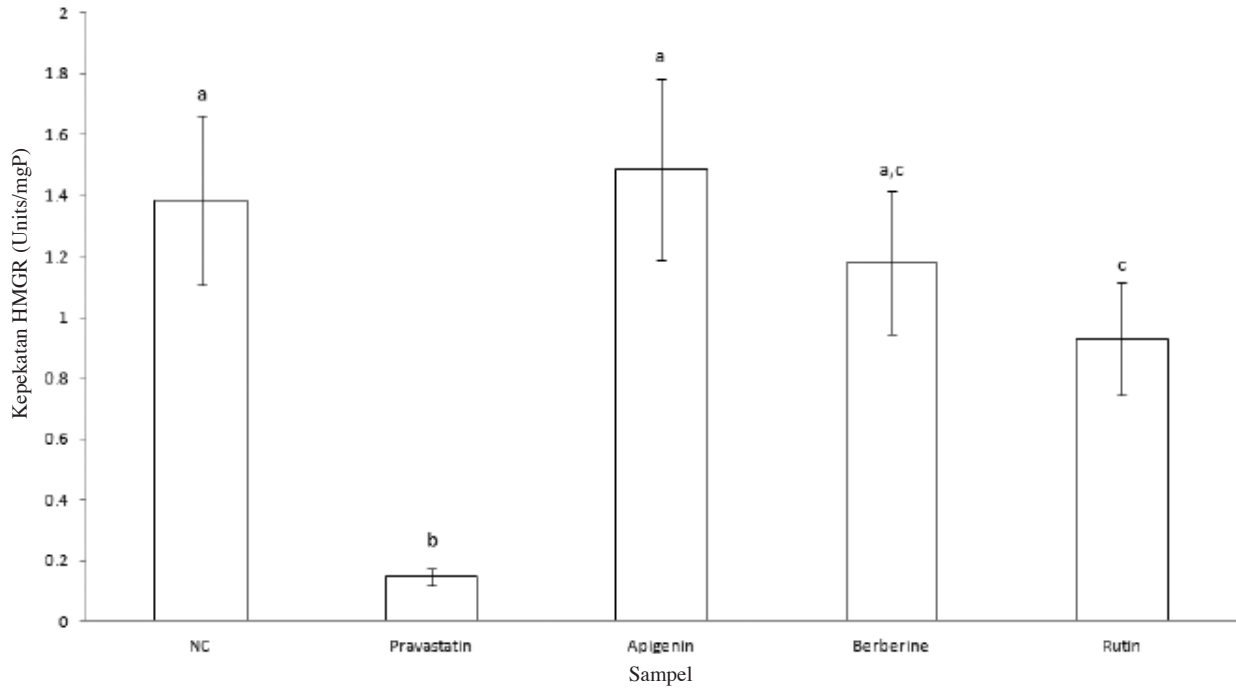
UJI KAJI UNTUK MELIHAT PENGARUH APIGENIN, BERBERIN DAN RUTIN DALAM MENGAWAL KEPEKATAN APO A1, LCAT, LDLR DAN FDFT1 PADA SEL HEP G2

Apo A1 Rajah 3 menunjukkan Berberin menyebabkan sel Hep G2 melepaskan APO A1 dalam jumlah yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding kawalan normal dan kawalan

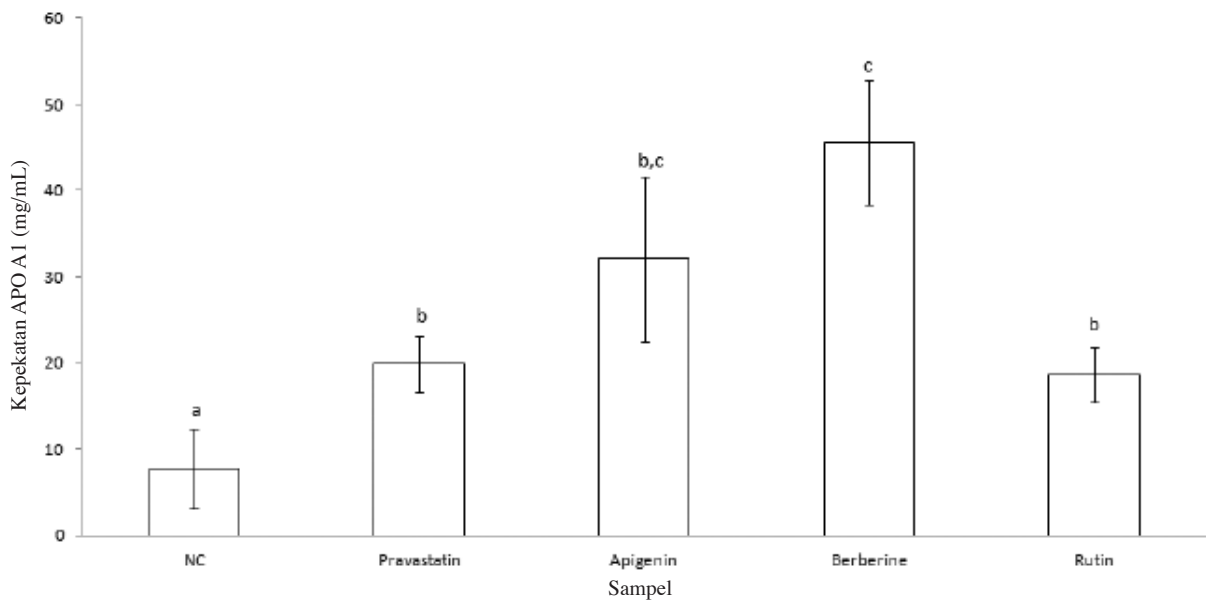
pravastatin. Apigenin juga menyebabkan penghasilan APO A1 yang tinggi, walau bagaimanapun ia tidak signifikan berbanding kawalan Pravastatin. Manakala Rutin pula menyebabkan sel Hep G2 menghasilkan APO A1 yang signifikan lebih banyak berbanding kawalan normal. Apolipoprotein A1 adalah molekul yang sangat penting untuk pembentukan lipoprotein berketumpatan tinggi (HDL) (Myoungsook et al. 2001). Melalui pembentukan molekul HDL oleh APO A1, proses pengangkutan kolesterol berbalik dapat dilakukan. Pengangkutan kolesterol berbalik adalah laluan untuk kolesterol diangkut dari plak aterosklerosis atau lipid dari sel periferan kembali ke hati dan dikumuhkan ke dalam najis melalui hempedu (Stephen & Matthew 1997). Daripada hasil kajian, didapati Apigenin, Berberin dan Rutin berpotensi tinggi dalam membantu proses pengawalan kolesterol melalui pengangkutan kolesterol berbalik.

LCAT Selain APO A1, LCAT juga adalah molekul penting dalam proses pengangkutan kolesterol berbalik (Dominic 2012). Hasil kajian menunjukkan dalam keadaan kawalan normal, sel Hep G2 juga merembeskan enzim LCAT. Rajah 4 menunjukkan rawatan Apigenin, Berberin dan Rutin telah meningkatkan penghasilan enzim LCAT secara signifikan berbanding kawalan normal. Kawalan pravastatin menunjukkan jumlah LCAT tertinggi.

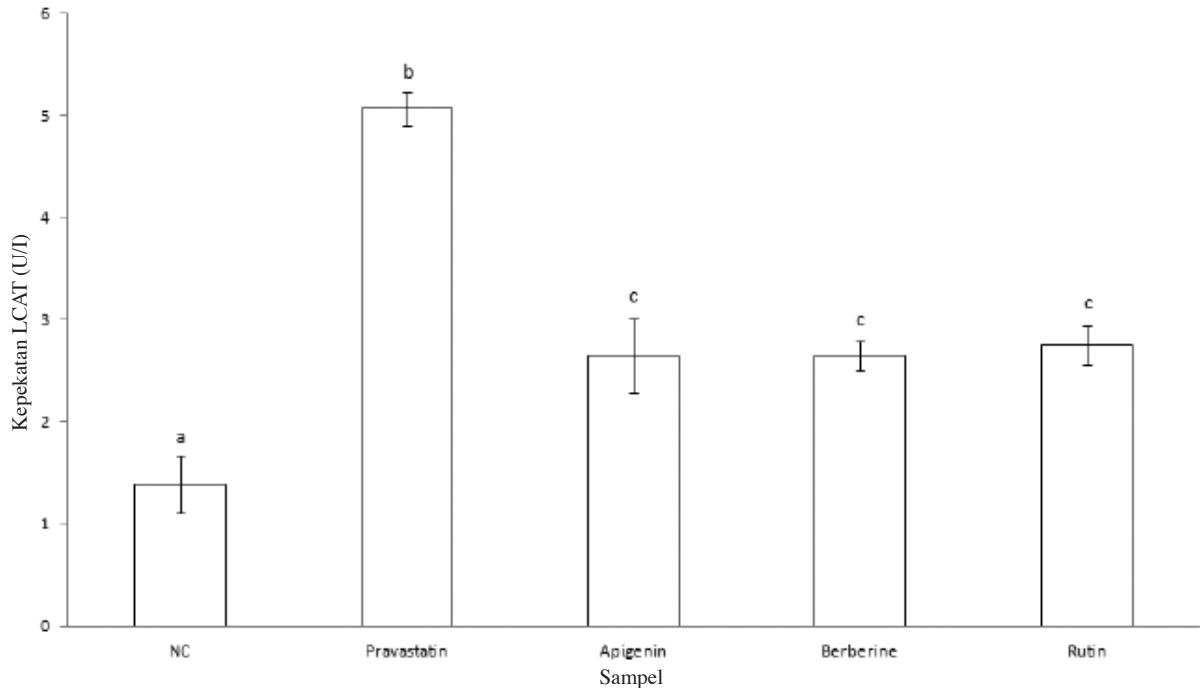
LDLR Penghasilan kolesterol secara endogenus bermula dari hati, kolesterol hepatic dilepaskan ke peredaran darah sebagai lipoprotein berketumpatan sangat rendah (VLDL) dan proses metabolisme terjadi apabila pembentukan lipoprotein sisa berlaku selepas lipoprotein lipase membuang trigliserida (TG) daripada VLDL. Lipoprotein sisa dikeluarkan



RAJAH 2. Kepekatan HMGR di dalam media terhadap rawatan sampel (NC: tanpa rawatan. Pravastatin: Rawatan 3×10^{-7} M Pravastatin. Apigenin: Rawatan $7.82 \mu\text{g/mL}$ Apigenin. Berberin: Rawatan $31.25 \mu\text{g/mL}$ Berberin. Rutin: Rawatan $62.5 \mu\text{g/mL}$ Rutin). ^{a,b}Huruf yang berbeza pada carta menunjukkan perbezaan yang bererti ($p < 0.05$)



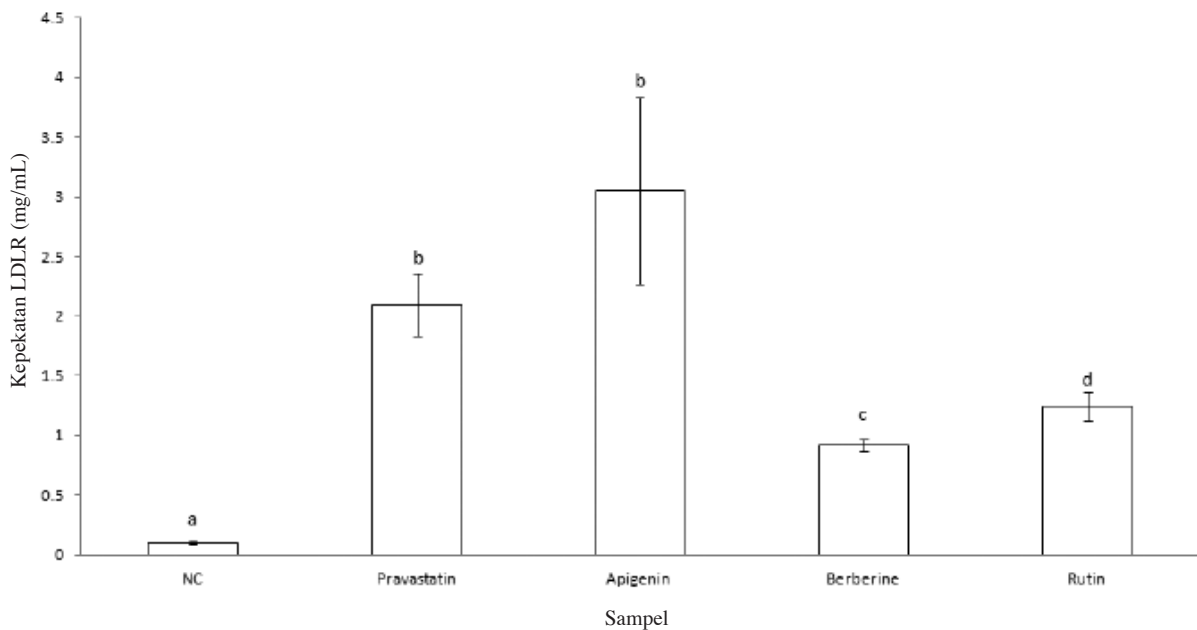
RAJAH 3. Kepekatan APO A1 di dalam media terhadap rawatan sampel (NC: tanpa rawatan. Pravastatin: Rawatan 3×10^{-7} M Pravastatin. Apigenin: Rawatan $7.82 \mu\text{g/mL}$ Apigenin. Berberin: Rawatan $31.25 \mu\text{g/mL}$ Berberin. Rutin: Rawatan $62.5 \mu\text{g/mL}$ Rutin). ^{a,b}Huruf yang berbeza pada carta menunjukkan perbezaan yang bererti ($p < 0.05$)



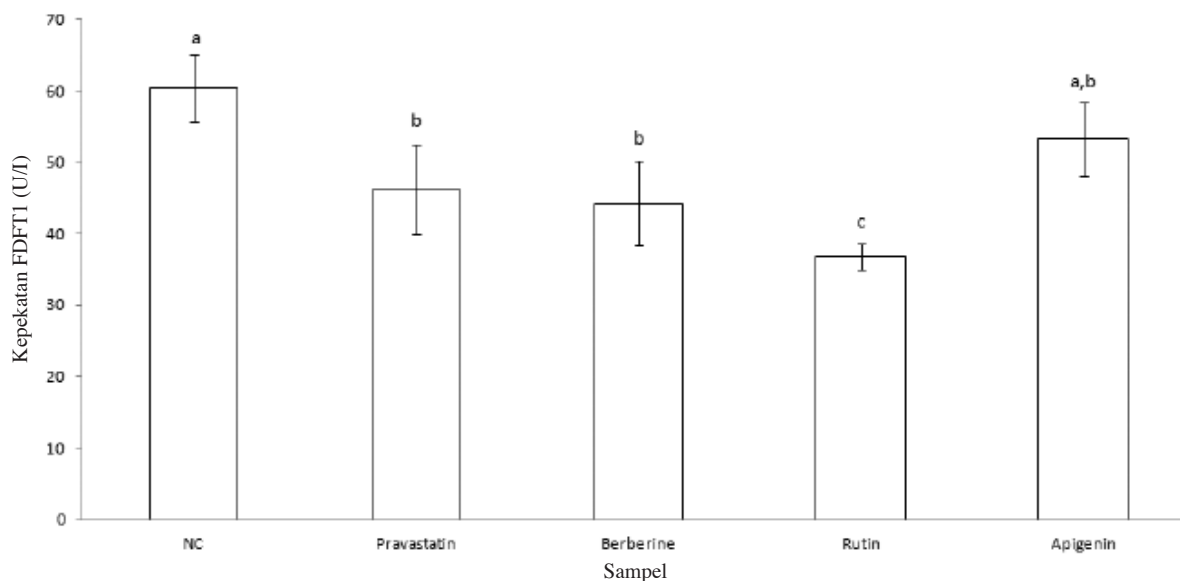
RAJAH 4. Kepekatan LCAT di dalam media terhadap rawatan sampel (NC: tanpa rawatan. Pravastatin: Rawatan 3×10^{-7} M Pravastatin. Apigenin: Rawatan $7.82 \mu\text{g/mL}$ Apigenin. Berberin: Rawatan $31.25 \mu\text{g/mL}$ Berberin. Rutin: Rawatan $62.5 \mu\text{g/mL}$ Rutin). ^{a,b}Huruf yang berbeza pada carta menunjukkan perbezaan yang bererti ($p < 0.05$)

daripada aliran darah melalui reseptor LDL (LDL R) atau terus dimetabolisme untuk menjadi LDL dan kemudian LDL diambil oleh hati melalui reseptor LDLR (John 2002). Rajah 5 menunjukkan bahawa rawatan ketiga-tiga sebatian dapat meningkatkan penghasilan LDLR oleh Hep G2. Apigenin

menunjukkan kesan yang signifikan ($p < 0.05$) dalam meningkatkan kepekatan LDLR berbanding kawalan normal. Berberin juga menunjukkan kesan yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding kawalan normal tetapi rendah secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kawalan pravastatin.



RAJAH 5. Kepekatan LDLR di dalam media terhadap rawatan sampel (NC: tanpa rawatan. Pravastatin: Rawatan 3×10^{-7} M Pravastatin. Apigenin: Rawatan $7.82 \mu\text{g/mL}$ Apigenin. Berberin: Rawatan $31.25 \mu\text{g/mL}$ Berberin. Rutin: Rawatan $62.5 \mu\text{g/mL}$ Rutin). ^{a,b}Huruf yang berbeza pada carta menunjukkan perbezaan yang bererti ($p < 0.05$)



RAJAH 6. Kepekatan FDFIT1 di dalam media terhadap rawatan sampel (NC: tanpa rawatan. Pravastatin: Rawatan 3×10^{-7} M Pravastatin. Apigenin: Rawatan $7.82 \mu\text{g/mL}$ Apigenin. Berberin: Rawatan $31.25 \mu\text{g/mL}$ Berberin. Rutin: Rawatan $62.5 \mu\text{g/mL}$ Rutin). ^{a,b}Huruf yang berbeza pada carta menunjukkan perbezaan yang bererti ($p < 0.05$)

FDFT1 Amin et al. (1996) menjelaskan bahawa *FDFT1* dianggap sebagai enzim penting yang menyebabkan pembentukan squalene secara eksklusif disalurkan ke dalam pembentukan kolesterol selepas melalui pelbagai langkah. Rawatan yang dapat menurunkan kepekatan *FDFT1* dalam media adalah dianggap berguna untuk menurunkan pembentukan kolesterol. Hasil kajian (Rajah 6) menunjukkan Rutin mampu secara signifikan ($p < 0.05$) merendahkan penghasilan enzim *FDFT1* oleh Hep G2 berbanding kawalan normal. Rawatan Berberin adalah tidak signifikan berbanding rawatan Pravastatin. Walau bagaimanapun, Apigenin tidak berbeza secara signifikan berbanding kawalan normal.

KESIMPULAN

Rawatan Apigenin, Berberin dan Rutin menunjukkan kesan yang signifikan dalam menurunkan metabolisme kolesterol. Kemampuan Rutin dalam menurunkan enzim HMGCR dan *FDFT1* membolehkan ia mengawal pembentukan kolesterol endogenus. Selain itu, rawatan ketiga-tiga ekstrak ini menyebabkan kenaikan kepekatan APO A1, LCAT dan LDLR menunjukkan kemungkinan ekstrak ini boleh mengawal kolesterol dalam badan melalui tapak jalan pengangkutan kolesterol berbalik.

RUJUKAN

- Abidi, P., Chen, W., Kraemer, F.B., Li, H. & Liu, J. 2006. The medicinal plant goldenseal is a natural LDL-lowering agent with multiple bioactive components and new mechanism. *Journal of Lipid Research* 47: 2134-2147.
- Amin, D., Cornell, S.A., Perrone, M.H. & Bilder, G.E. 1996. 1-Hydroxy-3-(methylpentylamino)-propylidene-1,1-bisphosphonic acid as a potent inhibitor of squalene synthase. *Arzneimittelforschung* 46(8): 759-762.
- Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F., Natali, P. & Brunetti, M. 2000. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *International Journal of Cancer* 87: 595-600.
- Chia, J.C., Thing, F.T., Shorong, S.L., Yuan, S.C. & I-Min, L. 2012. Regulation of lipid disorders by ethanol extracts from Zingiber zerumbet in high-fat diet-induced rats. *Food Chemistry* 132(1): 460-467.
- Chidambara, M.K.N., Jinhee, K., Amit, V. & Bhimanagouda, S.P. 2012. Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. *Food Chemistry* 132(1): 27-34.
- Colditz, G.A. 1999. Economic costs of obesity and inactivity. *Medicine Science and Sports Exercise* 31: S663-667.
- Conlin, P.R. 1999. The dietary approaches to stop hypertension (Dash) clinical trial: Implications for lifestyle modifications in the treatment of hypertensive patients. *Cardiology Review* 7: 284-288.
- Diogo, C.V., Machado, N.G., Barbosa, I.A., Serafim, T.L., Burgeiro, A. & Oliveira, P.J. 2011. Berberine as a promising safe anti-cancer agent - is there a role for mitochondria? *Current Drug Targets* 12(6): 850-859.
- Dominic, S.N. 2012. The role of lecithin: Cholesterol acyltransferase in the modulation of cardiometabolic risks - A clinical update and emerging insights from animal models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821(4): 654-659.
- Ge, Y., Zhang, Y., Li, R., Chen, W., Li, Y. & Chen, G. 2011. Berberine regulated Gck, G6pc, Pck1 and Srebp-1c expression and activated AMP-activated protein kinase in primary rat hepatocytes. *International Journal of Biological Science* 7(5): 673-684.
- Goulas, V. & Manganaris, G.A. 2012. Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry* 131(1): 39-47.

- Hana, K., Jeong, Y.M., Hyeonji, K., Dong-Sun, L., Moonjae, C., Hyung-Kyoon, C., Young, S.K., Ashik, M. & Somi, K.C. 2010. Antioxidant and antiproliferative activities of Mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chemistry* 121(2): 429-436.
- Hubert, S., Renana, S., Hedi, G., Markus, N., Heinrich, W. & Winfried, M. 2001. Effect of atorvastatin, simvastatin, and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in Hep G2 cells. *Biochemical Pharmacology* 62: 1545-1555.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P. & Sebastiani, L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition Analysis* 21: 589-598.
- Imanshahidi, M. & Hosseinzadeh, H. 2008. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytotherapy Research* 22(8): 999-1012.
- John, F.O. 2002. Molecular basis of cholesterol homeostasis: Lessons from Tangier disease and ABCA1. *TRENDS in Molecular Medicine* 8: 4.
- KKM, Kementerian Kesihatan Malaysia. 2011. Portal Rasmi Kementerian Kesihatan Malaysia. www.moh.gov.my/images/gallery/stats/health_fact/health_facts_2010_hor.pdf
- Kulkarni, S.K. & Dhir, A. 2010. Berberine: A plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytotherapy Research* 24(3): 317-324.
- Kyoung, H.K., Ki, W.L., Dong, Y.K., Hyung, H.P., Ik, B.K. & Hyong, J.L. 2005. Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization. *Bioresource Technology* 96(15): 1709-1712.
- Leeder, S., Raymond, S., Greenberg, H., Liu, H. & Esson, K. 2004. *A Race against Time: The Challenge of Cardiovascular Disease in Developing Countries*. New York: Trustees of Columbia University.
- Lien-Chai, C., Lean, T.N., I-Cheng, L., Po-Lin, K. & Chun-Ching, L. 2006. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. *Cancer Letters* 237: 207-214.
- McMurray, J.J. & Stewart, S. 2000. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83(5): 596-602.
- Myoungsook, L., Jin, Q.K., Jongwon, K., Hyunhee, O. & Miyoung, P. 2001. Studies on the plasma lipid profiles, and LCAT and CETP activities according to hyperlipoproteinemia phenotypes (HLP). *Atherosclerosis* 159(2): 381-389.
- Nitra, N., Ank, H.L. & Kornkanok, I. 2004. Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidant activity. *Naresuan University Journal* 12(2): 25-37.
- Olle, L. 1996. HMG-CoA reductase inhibitors: Role in normal and malignant cells. *Oncology/Hematology* 22: 197-212.
- Peter, J.M., Barbara, L., Hubert, S., Stephen, K. & Karin, B. 2010. Effect of simvastatin on cholesterol metabolism in C2C12 myotubes and Hep G2 cells, and consequences for statin-induced myopathy. *Biochemical Pharmacology* 79: 1200-1209.
- Siniša, Đ., Milorad, C. & Salameh, A. 2000. The extraction of Apigenin and Luteolin from the sage *salvia officinalis* L. from Jordan. University of Niš, FACTA UNIVERSITATIS: *Working and Living Environmental Protection* 1(5): 87-93.
- Stephen, A.H. & Matthew, J.M. 1997. Reverse cholesterol transport - A review of the process and its clinical implications. *Clinical Biochemistry* 30(7): 517-525.
- Sun-Young, P., Song-Hae, B., Seon-Min, J., Yong, B.P., Soon-Jae, L., Tae-Sook, J. & Myung-Sook, C. 2002. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutrition Research* 22: 283-295.
- Susan, H.K. 2005. The use of rutin in a cat with idiopathic chylothorax. *Canada Veterinary Journal* 46(8): 729-731.
- Su-Tze, C., Hsui-Hui, C., Hsin-Yi, P., Meei-Jen, L. & Tian-Shung, W. 2011. Isolation of substances with antiproliferative and apoptosis-inducing activities against leukemia cells from the leaves of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb. & Zucc. *Phytomedicine* 18(5): 344-348.
- Tsutomu, F., Kunihiko, S. & Akira, I. 1972. Isolation of berberine from callus tissue of *Coptis japonica*. *Phytochemistry* 11(1): 175.
- Vadakkemuriyil, D.N., Rajaram, P. & Ragupathi, G. 2012. Studies on methanolic extract of *Rauvolfia* species from southern Western Ghats of India – *In vitro* antioxidant properties, characterization of nutrients and phytochemicals. *Industrial Crops and Products* 39: 17-25.
- Verma, P.R., Deshpande, S.A., Kamtham, Y.N. & Vaidya, L.B. 2012. Hypolipidemic and antihyperlipidemic effects from an aqueous extract of *Pachyptera hymenaea* (DC.) leaves in rats. *Food Chemistry* 132(3): 1251-1257.
- Wang, I., Lin-Shiau, S. & Lin, J.K. 1999. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome *c* release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *European Journal of Cancer* 35: 1517-1525.
- Wen, Q., Jacqaleline, I., Shu-Ren, W. & Recaredo, I. 1992. Regulation of HMG-CoA reductase, apoprotein-B and LDL receptor gene expression by the hypocholesterolemic drugs simvastatin and ciprofibrate in Hep G2, human and rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1127: 57-66.
- Zhenchang, L., Yingzhen, Y., Lailiang, C. & Gan-Yuan, Z. 2012. Poly-phenolic composition and content in the ripe berries of wild *Vitis* species. *Food Chemistry* 132(2): 730-738.
- Mohd Kamal Nik Hassan*, Rasadah Mat Ali, Mohd Shahidan Mohd Arshad, Zamree Md Shah, Khairul Kamilah Abdul Kadir & Ihsan Safwan Kamarazaman Bahagian Hasil Semula Jadi Pusat Penyelidikan Perhutanan Malaysia 52109 Kepong, Kuala Lumpur Malaysia
- Zulkhairi Hj. Amom
Fakulti Sains Kesihatan
UiTM Kampus Puncak Alam
42300 Puncak Alam, Selangor
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: mohdkamal@frim.gov.my

Diserahkan: 12 Mac 2012
Diterima: 31 Julai 2013