

## Mitigasi *Nigella sativa* dan *Moringa oleifera* terhadap Fragmentasi DNA Sperma melalui Aktiviti Antioksidan pada Tikus Aruhan-Obesiti

(Mitigation of *Nigella sativa* and *Moringa oleifera* against Sperm DNA Fragmentation through Antioxidant Activity in Obesity-Induced Rats)

IMAN EMIR MOHAMAD ARRIF EMIR & MAHANEM MAT NOOR\*

Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 30 April 2024/Diterima: 12 Ogos 2024

### ABSTRAK

Obesiti telah menjadi kebimbangan kesihatan global dan kesannya terhadap kesihatan reproduktif terutamanya pada lelaki telah mendapat perhatian. Kajian ini menggunakan tikus jantan aruhan-obesiti sebagai haiwan model untuk mengkaji potensi terapeutik *Nigella sativa* (NS) dan *Moringa oleifera* (MO) dalam menangani isu ketidaksuburan berkaitan dengan obesiti. Kajian ini memberi tumpuan kepada sifat antioksidan *N. sativa* dan *M. oleifera* dan potensinya untuk mengurangkan tekanan oksidatif dan fragmentasi DNA sperma dengan kedua-duanya menjadi punca utama kepada masalah ketidaksuburan jantan yang disebabkan oleh obesiti. Kajian ini menggunakan 36 ekor tikus jantan Sprague Dawley yang dibahagikan kepada dua kumpulan utama, iaitu kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan yang setiapnya terdiri daripada enam ekor tikus. Kumpulan kawalan dibahagikan pula kepada tiga subkumpulan iaitu kumpulan normal, negatif (tikus teraruh obesiti tanpa rawatan) dan positif (tikus teraruh obesiti yang diberi 10 mg/kg/hari orlistat). Kumpulan rawatan dibahagikan kepada tiga subkumpulan iaitu kumpulan NS200 (200 mg/kg/hari), MO400 (400 mg/kg/hari) dan MO400+NS200 (MO (400 mg/kg/hari) + NS (200 mg/kg/hari)) selama 40 hari tempoh rawatan. Semua tikus kajian kecuali kumpulan normal teraruh obesiti dengan diberi diet tinggi lemak (HFD) sehingga mencapai nilai indeks Lee melebihi 310 sebelum diberi rawatan. Keputusan menunjukkan peningkatan aktiviti khusus enzim SOD yang signifikan ( $p < 0.05$ ), pengurangan signifikan dalam penanda tekanan oksidatif (MDA) ( $p < 0.05$ ) dan pengurangan peratusan fragmentasi DNA sperma yang signifikan ( $p < 0.05$ ) pada tikus yang masing-masing dirawat dengan herba NS, MO dan MO+NS berbanding dengan tikus kawalan negatif. Keputusan ini memberikan maklumat penting tentang mekanisme tindakan antioksidan herba NS dan MO yang berupaya memberi kesan perlindungan terhadap kesihatan reproduktif jantan dalam konteks obesiti.

Kata kunci: Fragmentasi DNA sperma; *Moringa oleifera*; *Nigella sativa*; obesiti, tekanan oksidatif

### ABSTRACT

Obesity has become a global health concern and its impact on reproductive health, especially in men gaining attention. This study used obese-induced male rats as an animal model to investigate the therapeutic potential of *Nigella sativa* (NS) and *Moringa oleifera* (MO) in addressing infertility issues related to obesity. The study focused on the antioxidant properties of *N. sativa* and *M. oleifera* and their potential to reduce oxidative stress and sperm DNA fragmentation, both of which are major causes of male infertility associated with obesity. The study utilized 36 male Sprague Dawley rats divided into two main groups, namely the control group and the treatment group, each consisting of six rats. The control group was further divided into three subgroups: normal, negative (obese-induced rats without treatment), and positive (obese-induced rats given 10 mg/kg/day orlistat). The treatment group was divided into three subgroups: NS200 group (200 mg/kg/day), MO400 group (400 mg/kg/day), and MO400+NS200 (MO (400 mg/kg/day) + NS (200 mg/kg/day)) group for a treatment period of 40 days. All rats, except those in the normal group, were induced into obesity through a high-fat diet (HFD) until their Lee index exceeded 310, before treatment. The results showed a significant increase in specific SOD enzyme activity ( $p < 0.05$ ), a significant reduction in oxidative stress marker (MDA) ( $p < 0.05$ ), and a significant reduction in sperm DNA fragmentation percentage (%SDF) ( $p < 0.05$ ) in rats treated with NS, MO, and MO+NS herbs respectively compared to the negative control rats. These findings provide important information on the antioxidant mechanisms of NS and MO herbs that are capable of providing protective effects on male reproductive health in the context of obesity.

Keywords: *Moringa oleifera*; *Nigella sativa*; obesity; oxidative stress; sperm DNA fragmentation

## PENGENALAN

Berdasarkan tinjauan kesihatan dan morbiditi negara, kes obesiti di Malaysia semakin meningkat daripada 15.1% pada tahun 2011 kepada 17.7% pada tahun 2015 dan akhirnya meningkat sehingga 19.9% pada tahun 2019 yang melibatkan kebanyakannya golongan dewasa (Chong et al. 2023). Malaysia kini menduduki tempat pertama bagi kes obesiti tertinggi di seluruh negara Asia iaitu sebanyak 17.9% pada tahun 2023 (Wisevoter 2023). Keadaan bertambah buruk apabila sejajar dengan peningkatan kes obesiti, masalah ketidaksuburan juga meningkat sebanyak 10%-15% pada setiap tahun dan 50% daripada kes tersebut melibatkan ketidaksuburan lelaki (Palaniappan 2023). Obesiti adalah ketidakimbangan kesihatan yang semakin meningkat di seluruh dunia, dikaitkan dengan pelbagai gangguan metabolik dan disfungsi pembiakan (Leisegang et al. 2021). Salah satu akibat ketara obesiti ialah kemerosotan kesuburan yang boleh menjejaskan kedua-dua lelaki dan perempuan. Ketidaksuburan yang disebabkan oleh obesiti pada lelaki khususnya telah dikaitkan dengan perubahan dalam profil hormon androgen serta kualiti sperma dan fungsi testis yang terjejas (Pourmasumi et al. 2017). Walaupun penggunaan orlistat sebagai rawatan konvensional berkesan dari segi pengurangan berat badan/obesiti, namun orlistat tidak mampu memperbaiki masalah ketidaksuburan lelaki akibat obesiti. Oleh itu, pendekatan rawatan alternatif menggunakan herba merupakan rawatan tradisi yang berpotensi dalam merawat pelbagai jenis penyakit khususnya obesiti dan ketidaksuburan dalam kalangan pesakit lelaki. Herba seperti *Nigella sativa* (NS) dan *Moringa oleifera* (MO) berupaya menawarkan manfaat dwi-fungsi dengan bukan sahaja membantu dalam pengurangan berat badan (Bordoni et al. 2019) tetapi juga meningkatkan aktiviti antioksidan dan secara signifikan meningkatkan kesuburan lelaki (Cho Ping, Hashim & Hasan Adli 2014).

Ketidaksuburan adalah keadaan yang kompleks dan telah menjejaskan berjuta-juta pasangan di seluruh dunia kerana kegagalan untuk mendapatkan zuriat (Vander Borgh & Wyns 2018). Antara faktor yang menyumbang kepada ketidaksuburan, obesiti telah muncul sebagai faktor risiko yang signifikan, terutamanya bagi lelaki (Ameratunga, Gebeh & Amoako 2023). Obesiti bukan sahaja menjejaskan fungsi pembiakan keseluruhan tetapi juga memberi kesan buruk terhadap kualiti sperma dan integriti DNA yang membawa kepada penurunan kadar kesuburan (Duale et al. 2014). Satu mekanisme utama yang mendasari kesan buruk ini ialah fragmentasi DNA sperma yang disebabkan oleh tekanan oksidatif (Asadi et al. 2017). Tekanan oksidatif berlaku apabila terdapat ketidakseimbangan antara penghasilan spesies oksigen

reaktif (ROS) dan keupayaan mekanisme pertahanan antioksidan tubuh untuk meneutralkannya (Yang et al. 2020). Dalam keadaan obes, kehadiran tisu adipos yang berlebihan membawa kepada keadaan keradangan kronik yang ringan yang merangsang penjanaan ROS (Yi et al. 2020). Menurut Aitken (2023), tekanan oksidatif ini bukan saja berpotensi untuk memediasi warisan transgenerasi obesiti, malah berupaya untuk memediasi perubahan epigenetik pada spesies RNA kecil yang terdapat dalam sperma yang dihasilkan. Molekul ROS ini boleh menyebabkan kerosakan pada komponen sel, termasuk lipid, protein dan DNA.

*Nigella sativa* (NS) adalah ahli keluarga *Ranunculaceae* dan berasal dari Asia Barat Daya. Biji NS mengandungi pelbagai sebatian bioaktif, termasuk *thymoquinone*, yang mempunyai sifat antioksidan, anti-radang dan anti-obesiti (Darand et al. 2019). Kajian telah menunjukkan bahawa suplemen minyak biji NS boleh mengurangkan komplikasi berkaitan obesiti dengan memperbaiki parameter metabolik, mengurangkan tekanan oksidatif dan memodulasi ketidakseimbangan hormon (Tüfek et al. 2015). Tambahan pula, NS telah menunjukkan kesan yang menguntungkan pada fungsi pembiakan lelaki dengan meningkatkan kualiti sperma, memperbaiki histologi testis dan memulihkan keseimbangan hormon androgen (Cho Ping, Hashim & Hasan Adli 2014).

*Moringa oleifera* (MO) pula adalah tumbuhan yang berasal daripada kawasan tropika dan subtropika serta terkenal dengan pelbagai nutrisi. Herba ini mengandungi banyak sebatian bioaktif, termasuk flavonoid, asid fenolik dan glukosinolat yang menunjukkan aktiviti antioksidan, anti-radang dan anti-obesiti (Gopalakrishnan, Doriya & Kumar 2016). Kajian terdahulu mencadangkan bahawa suplemen MO mampu membantu masalah ketidaksuburan yang disebabkan oleh obesiti dengan meningkatkan parameter metabolik, mengurangkan adipositi dan memulihkan ketidakseimbangan hormon (Zade et al. 2013). Selain itu, MO juga menunjukkan potensi dalam meningkatkan kualiti sperma (Kamalrudin, Jasamai & Mat Noor 2018; Kamar Bashah & Mat Noor 2021), melindungi tisu testis daripada kerosakan oksidatif, dan menggalakkan sintesis hormon pembiakan (Vergara-Jimenez, Almatrafi & Fernandez 2017).

Oleh yang demikian, kajian ini dilaksanakan bagi membuktikan keberkesanan minyak *N. sativa* dan ekstrak akues daun *M. oleifera* yang berfungsi sebagai antioksidan dalam memperbaiki masalah ketidaksuburan dalam kalangan lelaki obes, melalui penggunaan haiwan model tikus jantan Sprague Dawley. Malah, kajian ini juga membolehkan pengenalanpastian keberkesanan minyak *N. sativa* dan ekstrak akues daun *M. oleifera* dalam mengurangkan fragmentasi atau kerosakan DNA sperma.

## BAHAN DAN KAEDAH KAJIAN

### SAMPEL HAIWAN DAN PENJAGAAN

Sampel haiwan diperoleh daripada Rumah Haiwan Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, sebanyak 36 ekor tikus jantan Sprague Dawley digunakan dalam kajian ini. Tikus jantan berumur 12 minggu dengan purata berat 250 g hingga 350 g digunakan dalam penyelidikan *in vivo* ini. Semua prosedur dan pengendalian haiwan dalam kajian ini dijalankan berlandaskan garis panduan yang ditetapkan oleh Universiti Kebangsaan Malaysia Animal Ethics Committee (UKMAEC) (Nombor kelulusan UKMAEC: FST/2021/MAHANEM/24-MAR./1169-APR.-2021-APR.-2023).

### SAMPEL HERBA

#### *Nigella sativa* (Habbatus sauda)

Minyak biji *Nigella sativa* (50 mL) diperoleh daripada Syarikat Herbliss (M) Sdn Bhd. (Selangor, Malaysia). Minyak NS ini mengandungi bahan antioksidan *Thymoquinone* (TQ) yang tinggi iaitu 20.04% (mg/g) selain daripada Omega 6. Minyak NS ini diberikan kepada tikus jantan secara suap paksa menggunakan *oral gavage* kepada kumpulan rawatan mengikut dos yang ditetapkan iaitu 200 mg/kg/hari (78.70  $\mu$ L sehari).

#### *Moringa oleifera* (POKOK KELOR)

Daun *Moringa oleifera* kering yang telah dikisar (500 g) diperoleh daripada syarikat Herbagus Trading (Penang, Malaysia). Serbuk MO tersebut ditimbang untuk menghasilkan ekstrak akues daun *M. oleifera* mengikut dos yang ditetapkan iaitu sebanyak 400 mg/kg (176.00  $\mu$ L sehari).

### PENYEDIAAN MAKANAN DIET TINGGI LEMAK (HFD)

Penyediaan makanan diet tinggi lemak (HFD) telah dilakukan mengikut kaedah Mat Noor, Mohamad Zin dan Shamsusah (2023) dengan pengubahsuaian. Pelet makanan diet tinggi lemak dihasilkan daripada campuran pelet tikus (Gold Coin) yang dikisar menjadi serbuk dan minyak sapi jenama Alzara dengan nisbah 5:2 mengikut berat. Makanan diet tinggi lemak diberi makan kepada tikus kajian secara *ad libitum*. Tikus yang mencecah nilai indeks Lee  $\geq 310$ , dikategorikan sudah mencapai tahap obesiti (Bastias-Pérez, Serra & Herrero 2020). HFD diberikan selama 40 hari kepada semua kumpulan kawalan dan rawatan kecuali kumpulan kawalan normal.

### PENYEDIAAN EKSTRAK AKUES DAUN *Moringa oleifera*

Serbuk *M. oleifera* direbus bersama air suling dengan menggunakan *heating mantle*, mengikut nisbah 1:4 dengan suhu 100 °C selama 15 minit. Setelah mencapai suhu bilik (20 °C -25 °C), hasil rebusan serbuk *M. oleifera* kemudiannya ditapis menggunakan 'cheesecloth'. Hasil tapisan ekstrak akues daun *M. oleifera* disimpan di dalam peti sejuk bersuhu 4 °C dan diberikan kepada tikus jantan kumpulan rawatan secara suap paksa menggunakan *oral gavage* mengikut dos 400 mg/kg/hari. Proses penyediaan ekstrak akues daun MO ini adalah berdasarkan kaedah Ododo, Ojeka dan Dapper (2019).

### REKA BENTUK KAJIAN

Sejumlah 36 ekor tikus jantan Sprague Dawley dibahagikan kepada dua kumpulan utama iaitu kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan dengan setiap pembahagian kumpulan mempunyai enam ekor tikus (n=6). Kumpulan kawalan dibahagikan kepada tiga sub-kumpulan iaitu kawalan normal yang diberi pelet makanan tikus (tanpa HFD, tanpa rawatan), kawalan negatif (HFD, tanpa rawatan) dan kawalan positif (HFD, rawatan 10 mg/kg/hari orlistat). Tikus kumpulan rawatan juga dibahagikan kepada tiga sub-kumpulan yang masing-masing terdiri daripada kumpulan NS 200 (HFD, rawatan minyak NS 200 mg/kg/hari), kumpulan MO400 (HFD, rawatan ekstrak MO400 mg/kg/hari) serta kumpulan MO400+NS200 (HFD, rawatan MO400 mg/kg/hari + NS 200 mg/kg/hari). Semua rawatan dimulakan setelah tikus mencapai tahap obes (indeks Lee  $\geq 310$ ). Rawatan diberikan mengikut dos yang ditetapkan selama 40 hari tempoh rawatan.

Dalam tempoh rawatan, pemberian HFD dihentikan dan diteruskan dengan pelet makanan tikus. Pemilihan dos herba MO dan NS ini adalah masing-masing berdasarkan kajian Leisegang, Almaghrawi dan Henkel (2021) dan Abd-Elnaby et al. (2022). Pelet makanan dan HFD diberikan secara *ad libitum* manakala untuk rawatan herba NS, MO, MO+NS dan orlistat + air suling diberi secara suap paksa menggunakan *oral gavage*.

### ANALISIS TEKANAN OKSIDATIF

#### *Penyediaan Sampel Tisu Testis*

Sampel tisu testis digunakan bagi analisis tahap peroksidasi lipid (MDA) dan aktiviti khusus enzim superoksida dismutase (SOD). Segala proses penyediaan sampel tisu testis bagi analisis tekanan oksidatif adalah berdasarkan protokol yang disediakan oleh pembekal kit SOLARBIO (nombor jenama: BC0020 (MDA) dan BC5160 (SOD)).

## ANALISIS FRAGMENTASI DNA SPERMA

*Penyediaan Sampel Sperma*

Proses penyediaan sampel sperma daripada tisu kauda epididimis tikus adalah berdasarkan protokol yang disediakan oleh pembekal kit *Micro Optic Gold Cyto-DNA* (nombor jenama: GC-SCD-20).

## ASAI MICRO OPTIC GOLD CYTO-DNA

Kit *Micro Optic Gold Cyto-DNA*, nombor jenama: GC-SCD-20, diperoleh daripada Syarikat YouNing Biotech (Guangzhou, China). Analisis fragmentasi DNA sperma adalah kaedah yang digunakan untuk menilai integriti kromatin DNA dalam sel sperma. Pengasaan ini memberikan maklumat tentang tahap kerosakan atau fragmentasi DNA dalam populasi sperma yang terkandung di dalam tisu testis tikus. Dalam konteks mengkaji obesiti pada tikus jantan, pengukuran peratusan fragmentasi DNA sperma (% SDF) boleh memberikan gambaran tentang potensi kesan obesiti terhadap kualiti dan kesuburan sperma (Sepidarkish et al. 2020). Peratusan fragmentasi DNA sperma dalam sampel sperma kauda epididimis dinilai berdasarkan jumlah sperma yang memiliki saiz halo yang berbeza. Menurut Yang et al. (2019), peratusan halo sperma sebanyak 15%-30% menandakan kadar fragmentasi DNA yang sederhana, manakala peratusan lebih daripada 30% (>30%) menandakan kadar fragmentasi DNA yang tinggi.

## ANALISIS STATISTIK (ANOVA)

Analisis statistik dilaksanakan menggunakan perincian Microsoft Excel 2016. Data daripada setiap kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan dipersembahkan dalam purata  $\pm$  SEM melalui analisis perbandingan min yang dilakukan menggunakan analisis varians (ANOVA). Analisis lanjut dilakukan menggunakan ujian *Post hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD)* untuk menentukan kumpulan tikus yang menunjukkan keputusan yang signifikan antara setiap kumpulan kawalan dan rawatan. Data dengan nilai  $p < 0.05$  adalah dianggap signifikan.

## HASIL DAN PERBINCANGAN

## ANALISIS TAHAP PEROKSIDASI LIPID (MDA)

Rajah 1 menunjukkan graf bar berkenaan tahap peroksidasi lipid (MDA) yang diperoleh daripada sampel kandungan protein tisu testis tikus aruhan-obesiti pada setiap kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan. Dapat diperhatikan bahawa tahap MDA tikus kumpulan kawalan negatif memiliki tahap MDA tertinggi iaitu  $2.21 \pm 0.11$  (nmol/mg prot). Tikus kumpulan kawalan negatif tidak menerima

sebarang rawatan orlistat ataupun herba untuk membantu mengurangkan pemendapan lemak dalam badan. Lemak yang terkumpul secara berlebihan ini menyebabkan peningkatan tahap asid lemak bebas dalam darah. Asid lemak ini boleh menjalani proses oksidatif, yang membawa kepada penjaanaan spesies oksigen reaktif (ROS) (Huang et al. 2015).

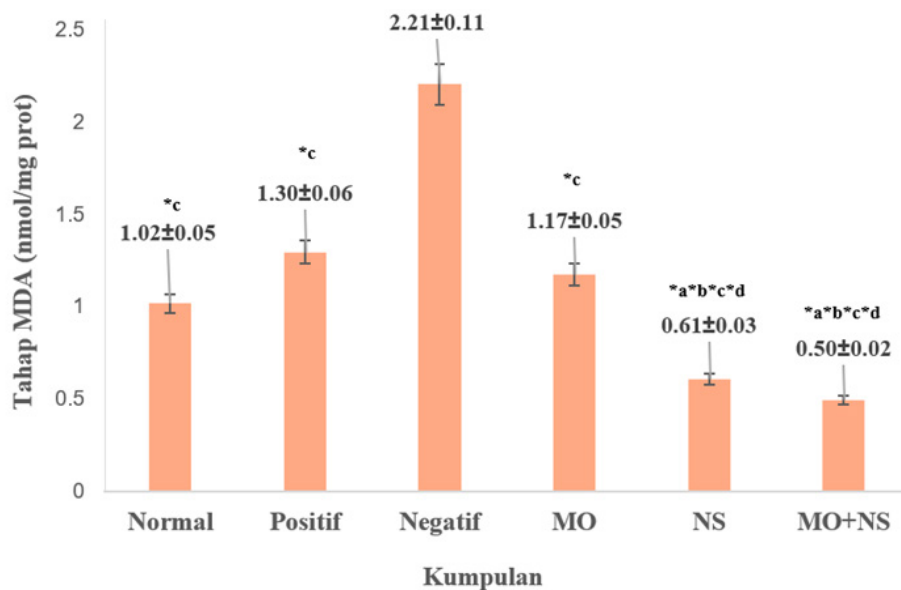
Bagi tikus kumpulan rawatan MO400, NS200 dan MO400+NS200, tahap MDA adalah lebih rendah berbanding tikus kawalan negatif ( $p < 0.05$ ). Hal ini kerana tikus tersebut menerima rawatan herba yang memiliki sebatian aktif seperti TQ dalam NS dan kuersertin serta *flavonoid* di dalam MO yang bertindak secara aktif sebagai agen antioksidan (Stoyanova et al. 2020). Meskipun tikus tersebut diaruh obesiti, namun terdapat mekanisme tindak balas daripada herba tersebut yang bertindak untuk mengurangkan jumlah lemak di dalam badan bagi mengelakkan penjaanaan spesies oksigen reaktif secara berlebihan. Herba sebagai agen antioksidan bertindak sebagai penampan bagi mengawal tekanan oksidatif yang berlaku di dalam darah (Tan et al. 2018). Oleh kerana itu, berdasarkan rajah tersebut, dapat dilihat perbezaan tahap MDA yang terhasil antara tikus yang menerima rawatan herba dan yang tidak menerima sebarang rawatan.

Berdasarkan analisis statistik ANOVA, penilaian mendapati bahawa perbezaan tahap MDA antara kesemua kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan menunjukkan perbezaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ). Ini memberi maksud bahawa intervensi herba pada tikus kumpulan rawatan dan orlistat pada tikus kumpulan positif mampu memberi pengaruh kepada penurunan tahap MDA secara signifikan antara kumpulan rawatan berbanding kumpulan kawalan.

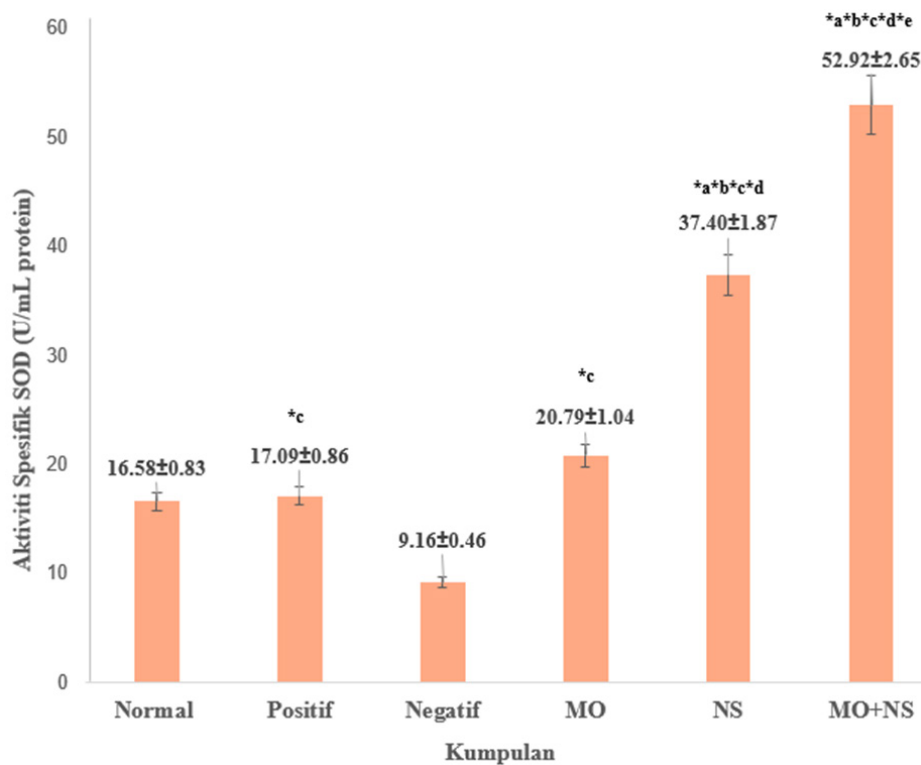
## ANALISIS AKTIVITI KHUSUS ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD)

Rajah 2 menunjukkan graf bar berkenaan purata aktiviti khusus enzim SOD yang diperoleh daripada sampel kandungan protein tisu testis tikus aruhan-obesiti pada setiap kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan. Berdasarkan rajah tersebut, dapat dilihat bahawa tikus kumpulan rawatan MO400+NS200 menunjukkan aktiviti enzim SOD tertinggi iaitu  $52.92 \pm 2.65$  (U/mL prot). Seterusnya, tikus kumpulan rawatan NS200 juga menunjukkan aktiviti enzim SOD yang memberangsangkan iaitu  $37.41 \pm 1.87$  (U/mL prot). Begitu juga dengan tikus kumpulan rawatan MO400 yang menunjukkan aktiviti enzim SOD yang agak tinggi iaitu sebanyak  $20.79 \pm 1.04$  (U/mL prot) berbanding dengan tikus kumpulan kawalan, khususnya kawalan negatif iaitu  $9.16 \pm 0.46$  (U/mL prot).

Peningkatan aktiviti khusus enzim SOD bagi tikus kumpulan rawatan ini membuktikan keberkesanan herba MO dan NS yang bertindak sebagai agen antioksidan



RAJAH 1. Purata tahap peroksidasi lipid (MDA) (nmol/mg protein) tikus jantan aruhan-obesiti bagi kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan selepas 40 hari tempoh rawatan. (\*) Nilai signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan a=normal, b=positif, c=negatif, d=MO



RAJAH 2. Purata aktiviti khusus SOD (U/mL protein) tikus jantan aruhan-obesiti bagi kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan selepas 40 hari tempoh rawatan. (\*) Nilai signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan a=normal, b=positif, c=negatif, d=MO, e=NS

dalam menurunkan tekanan oksidatif dalam tisu testis tikus jantan yang diaruh obesiti. NS dan MO kedua-duanya bertindak sebagai pemusnah oksigen radikal dan ini secara tidak langsung menyokong aktiviti enzim SOD secara aktif. NS bertindak dengan cara merangsang pengaktifan enzim SOD yang membawa kepada pertahanan yang lebih komprehensif terhadap tekanan oksidatif (Leong, Rais Mustafa & Jaarin 2013). Menurut Bordoni et al. (2019), NS turut memodulasi pengekspressan gen enzim SOD dan juga mengurangkan keradangan yang berlaku dalam tisu testis tikus aruhan obesiti. Segala tindakan ini membantu SOD untuk menjalankan peranannya sebagai pemusnah oksigen radikal dengan lebih cekap dan sekali gus mengurangkan tekanan oksidatif di dalam darah.

Begitu juga dengan herba MO yang bertindak meningkatkan aktiviti enzim SOD dengan cara mengurangkan keradangan yang berlaku dalam tisu testis tikus yang diaruh obesiti. Khususnya, komponen kuersetin dan *flavonoid* dalam MO bertindak sebagai agen pengelatan metal dengan komponen ini mengikat kepada ion metal yang menjadi punca kepada penjaan ROS (Susanto et al. 2019). Pengelatan kepada ion metal ini dapat membantu mengurangkan tekanan oksidatif di dalam darah. Tikus kawalan negatif menunjukkan aktiviti enzim SOD yang terendah antara semua iaitu hanya  $9.16 \pm 0.458$  (U/mL prot). Aktiviti enzim SOD yang rendah ini dapat dijelaskan dengan keadaan obes tikus jantan kumpulan negatif yang tidak menerima sebarang rawatan, sehingga mengakibatkan aktiviti antioksidan yang minimal bagi mengurangkan tekanan oksidatif di dalam tisu testis tikus tersebut.

Berdasarkan analisis statistik ANOVA, penilaian menunjukkan bahawa purata aktiviti khusus enzim SOD antara tikus kumpulan kawalan dan rawatan menunjukkan perbezaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ). Ini menandakan bahawa intervensi herba bagi kumpulan rawatan berupaya memberi kesan yang signifikan terhadap aktiviti khusus SOD yang terhasil bagi tikus jantan aruhan-obesiti jika dibandingkan dengan tikus daripada kumpulan kawalan negatif yang tidak menerima rawatan herba. Malah, intervensi herba NS, MO dan MO+NS juga terbukti berupaya mengatasi keupayaan orlistat (perubatan konvensional) dalam meningkatkan aktiviti antioksidan dalam tisu testis tikus (Rajah 2).

#### ANALISIS FRAGMENTASI DNA SPERMA

Rajah 3(A) menunjukkan imej sperma tikus kawalan normal. Daripada 300 ekor sperma yang dikira (Jadual 1), tikus kumpulan kawalan normal ini memiliki peratusan fragmentasi DNA sperma yang sederhana iaitu hanya 15.89%. Manakala Rajah 3(B) menunjukkan imej sperma tikus kumpulan kawalan positif. Daripada 300 ekor

sperma yang dikira (Jadual 1), tikus kumpulan kawalan positif ini menunjukkan nilai peratusan fragmentasi DNA sperma yang tinggi iaitu 39.33% ( $>30\%$ ). Menurut Suleiman et al. (2020), intervensi orlistat berupaya untuk menurunkan berat badan tikus secara signifikan dengan cara meningkatkan tahap hormon adiponektin. Orlistat turut mampu meningkatkan hormon steroidogenik yang membantu aktiviti metabolisme serta mengurangkan peratusan fragmentasi DNA sperma. Dalam hasil kajian ini, pemberian orlistat sememangnya berjaya menurunkan peratusan fragmentasi DNA sperma (39.33%) berbanding kumpulan kawalan negatif (41.89%) yang tidak diberi rawatan, namun peratusan SDF ini masih tinggi kerana mencecah  $>30\%$ . Oleh itu orlistat didapati tidak mampu memberi kesan mitigasi terhadap fragmentasi DNA sperma (Jadual 1) akibat obesiti walaupun berupaya menurunkan bacaan indeks Lee (data suplementari).

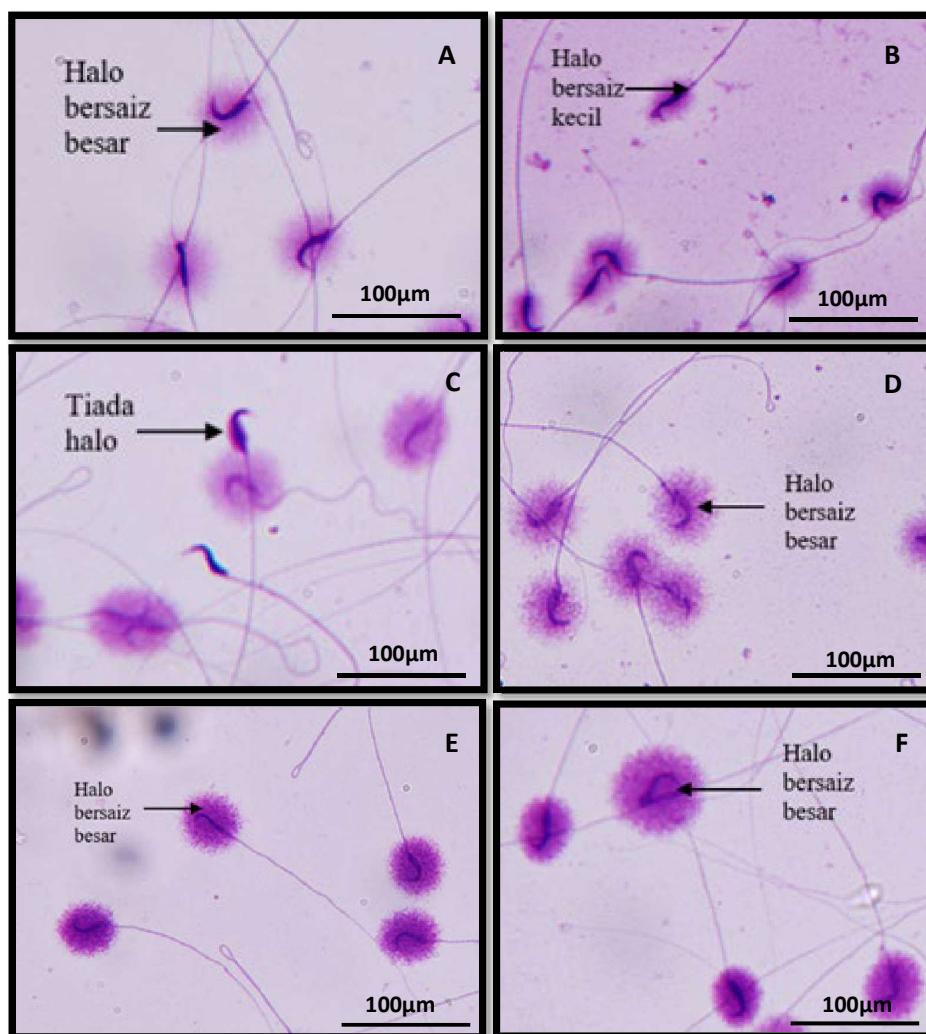
Rajah 3(C) menunjukkan imej sperma tikus kawalan negatif. Daripada 300 ekor sperma yang dikira, tikus kawalan negatif ini mencatatkan peratusan fragmentasi DNA sperma yang tertinggi berbanding semua kumpulan lain iaitu sebanyak 41.89% ( $>30\%$ ) (Jadual 1). Keadaan fragmentasi DNA sperma yang tinggi ini dapat dijustifikasikan dengan keadaan tikus kawalan negatif yang obes tidak menerima sebarang rawatan sehingga menyebabkan tiada sebarang mekanisme tindakan yang boleh membantu mengurangkan tahap peroksidasi lipid (MDA) di dalam testis tikus jantan tersebut. Kumpulan tikus ini juga merekodkan aktiviti enzim antioksidan SOD yang sangat rendah berbanding kumpulan tikus yang menerima rawatan. Tekanan oksidatif yang meningkat secara tidak langsung menjadikan DNA sperma mudah terdedah kepada fragmentasi semasa proses pemampatan DNA ke dalam kepala sperma (Dorostghoal et al. 2017). Rajah 3(D) pula menunjukkan imej sperma tikus kumpulan rawatan MO400 yang telah diaruh obesiti dan diberikan rawatan herba MO sebanyak 400 mg/kg/hari selama 40 hari tempoh rawatan. Daripada 300 ekor sperma yang dikira, tikus kumpulan rawatan MO400 ini merekodkan peratusan fragmentasi DNA sperma yang rendah iaitu sebanyak 11.33% ( $<15\%$ ) (Jadual 1). Tahap fragmentasi DNA sperma yang rendah ini menandakan keberkesanan herba MO yang signifikan ( $p < 0.05$ ) dalam menurunkan tekanan oksidatif dalam testis tikus jantan yang diaruh obesiti. Menurut Iommiello et al. (2015), kehadiran oksigen radikal yang rendah mengurangkan pendedahan DNA sperma kepada fragmentasi dan ini menjamin proses pemampatan DNA ke dalam kepala sperma secara lebih sempurna dan cekap.

Rajah 3(E) menunjukkan imej sperma tikus kumpulan rawatan NS200 yang telah diaruh obesiti dan diberikan rawatan NS sebanyak 200 mg/kg/hari selama 40 hari tempoh rawatan. Daripada 300 ekor sperma yang dikira, tikus kumpulan rawatan NS200 ini mencatatkan

JADUAL 1. Pengiraan purata jumlah sperma tikus aruhan-obesiti yang memiliki lingkaran halo dan peratusan SDF (%) bagi tikus kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan

Kumpulan	Lingkaran halo	Tiada halo/Sperma terdegradasi	Peratusan SDF (%)
Normal	252	48	15.89 <sup>*b*c</sup>
Positif	182	118	39.33
Negatif	173	127	41.89
MO	268	32	11.33 <sup>*a*b*c</sup>
NS	277	23	8.22 <sup>*a*b*c</sup>
MO+NS	284	16	5.78 <sup>*a*b*c</sup>

\*Superskrip pada lajur yang sama menandakan nilai signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding kumpulan a=normal, b=positif, c=negatif



RAJAH 3. Imej mikroskop sperma tikus kumpulan kawalan normal (A), kawalan positif (B), kawalan negatif (C), kumpulan rawatan MO400 (D), kumpulan rawatan NS200 (E), dan kumpulan rawatan MO400+NS200 (F) dalam magnifikasi 400×

peratusan fragmentasi DNA sperma yang rendah <15% iaitu sebanyak 8.22% (Jadual 1). Tahap fragmentasi DNA sperma yang rendah ini menandakan keberkesanan NS dalam menurunkan tekanan oksidatif dalam testis tikus jantan yang diaruh obesiti. NS berjaya menurunkan tahap tekanan oksidatif yang berlaku dalam testis tikus yang diaruh obesiti, sekali gus mengurangkan pendedahan DNA sperma terhadap pemecahan dan kerosakan (Sheikh, Joshi & Patel 2013). Menurut Alsanosi et al. (2022), sebatian aktif TQ yang terdapat di dalam NS memiliki keupayaan untuk memperbaiki kualiti DNA yang terkandung di dalam sperma. Rajah 3(F) menunjukkan imej sperma tikus kumpulan rawatan MO400+NS200 yang telah diaruh obesiti dan diberikan rawatan herba campuran MO(400 mg/kg)+NS(200 mg/kg) selama 40 hari tempoh rawatan. Daripada 300 ekor sperma yang dikira, tikus kumpulan rawatan MO400+NS200 ini mencatatkan peratusan fragmentasi DNA sperma terendah iaitu sebanyak 5.78% (<15%) (Jadual 1). Tahap fragmentasi DNA sperma kumpulan ini adalah tiga kali lebih rendah berbanding kumpulan kawalan normal (15.89%), bahkan lapan kali lebih rendah berbanding kawalan negatif (41.89%) menandakan keberkesanan campuran herba MO+NS dalam menurunkan tekanan oksidatif di dalam tisu testis tikus yang diaruh obesiti. MO dan NS bersinergi secara proaktif dalam mengurangkan pemendapan lemak dalam badan tikus, secara langsung mengurangkan lemak pada testis tikus jantan yang menyebabkan penjana ROS di dalam salur darah kawasan tisu testis tersebut. Menurut Rashki Ghaleo et al. (2021), apabila tekanan oksidatif berjaya diturunkan, maka DNA sperma juga semakin terlindung daripada keadaan yang boleh menyebabkan fragmentasi DNA berlaku khususnya semasa penukaran protein histon pada DNA kepada protamin. Ini dapat menjamin pemampatan DNA sperma yang berkualiti ke dalam kepala sperma semasa proses pematangan sperma. Menariknya, hasil ini seiring dengan hasil kajian terdahulu yang melaporkan peranan bahan antioksidan dalam mitigasi kerosakan DNA sperma akibat tekanan oksidatif. Menurut Hungerford, Bakos dan Aitken (2024), vitamin C yang merupakan salah satu antioksidan berupaya bukan saja meningkatkan vitaliti bahkan juga menurunkan peratusan sperma yang mengalami kerosakan DNA. Formulasi antioksidan berasaskan kajian turut membuktikan peranan antioksidan dalam menangani tekanan oksidatif yang merosakkan sperma DNA (Hug et al. 2023). Herba *Gynura procumbens* yang kaya dengan antioksidan seperti kuersetin turut terbukti membantu meningkatkan kualiti sperma mencit melalui peningkatan peratusan integriti DNA sperma (Anuar, Abu Bakar & Mat Noor 2018). Oleh itu hasil kajian ini membuktikan potensi herba MO dan NS

dalam memperbaiki integriti DNA sperma melalui aktiviti antioksidan. Ini secara tidak langsung dapat membantu mengurangkan masalah ketidaksuburan sperma dan risiko keabnormalan perkembangan embrio akibat kerosakan sperma DNA yang akhirnya membawa kepada keguguran di peringkat awal implantasi (Aitken 2023).

#### KESIMPULAN

Kajian ini berjaya membuktikan potensi minyak *Nigella sativa* (NS) dan ekstrak akues daun *Moringa oleifera* (MO) yang berfungsi sebagai antioksidan yang berkesan dalam memperbaiki masalah ketidaksuburan pada tikus jantan aruhan-obesiti. Dos minyak NS 200 mg/kg/hari dan dos ekstrak akues daun MO 400 mg/kg/hari serta campuran MO (400 mg/kg) + NS (200 mg/kg) menunjukkan keberkesanan dalam meningkatkan aktiviti enzim antioksidan SOD pada tisu testis tikus secara signifikan ( $p < 0.05$ ) di samping menurunkan indeks Lee (data suplementari). Penggunaan herba NS dan MO juga dapat menurunkan tahap peroksidasi lipid (MDA) secara signifikan ( $p < 0.05$ ) serta memberikan kesan mitigasi yang signifikan ( $p < 0.05$ ) terhadap peratusan fragmentasi DNA sperma akibat obesiti. Oleh itu, penggunaan tikus jantan aruhan-obesiti sebagai haiwan model dalam kajian ini dapat diekstrapolasi kepada lelaki yang mengalami masalah ketidaksuburan akibat gejala obesiti. Melalui hasil kajian pra-klinikal ini, herba NS, MO dan MO+NS telah terbukti berkesan sebagai agen antioksidan dan berupaya meningkatkan kualiti sperma daripada segi keutuhan DNA sperma. Oleh itu, intervensi herba ini berpotensi untuk diaplikasikan kepada manusia sebagai pendekatan terapeutik yang bermanfaat dalam menghadapi masalah ketidaksuburan lelaki yang terkait dengan obesiti.

#### PENGHARGAAN

Para penulis mengucapkan ribuan terima kasih kepada kakitangan Rumah Haiwan Fakulti Sains dan Teknologi atas bantuan teknikal dan Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi kerana menyediakan kemudahan infrastruktur penyelidikan. Penyelidikan ini mendapat bantuan kewangan melalui geran GUP-2020-084.

#### RUJUKAN

Abd-Elnaby, Y.A., ElSayed, I.E., AbdEldaim, M.A., Badr, E.A., Abdelhafez, M.M. & Elmadbouh, I. 2022. Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Moringa oleifera* against bisphenol-A-induced hepatotoxicity. *Egyptian Liver Journal* 12: 57.



- Alsanosi, S., Sheikh, R.A., Sonbul, S., Altayb, H.N., Batubara, A.S., Hosawi, S., Al-sakkaf, K., Abdullah, O., Omran, Z. & Alhosin, M. 2022. The potential role of *Nigella sativa* seed oil as epigenetic therapy of cancer. *Molecules* 27(9): 2779.
- Aitken, R.J. 2023. Sperm DNA integrity: A special issue exploring the causes, consequences, and treatment of DNA damage in human spermatozoa. *Andrology* 11: 1541-1544.
- Ameratunga, D., Gebeh, A. & Amoako, A. 2023. Obesity and male infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 90: 102393.
- Anuar, E., Abu Bakar, U. & Mat Noor, M. 2018. Kesan *Gynura procumbens* terhadap integriti DNA dan kualiti sperma mencit. *Sains Malaysiana* 47(9): 1991-1997.
- Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A. & Rafieian-Kopaei, M. 2017. The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: A review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 11(5): IE01-IE05.
- Bastías-Pérez, M., Serra, D. & Herrero, L. 2020. Dietary options for rodents in the study of obesity. *Nutrients* 12(11): 3234.
- Bordonì, L., Fedeli, D., Nasuti, C., Maggi, F., Papa, F., Wabitsch, M., De Caterina, R. & Gabbianelli, R. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Nigella sativa* oil in human pre-adipocytes. *Antioxidants* 8(2): 51.
- Cho Ping, N., Hashim, N.H. & Hasan Adli, D.S. 2014. Effects of *Nigella sativa* (*Habbatus sauda*) oil and nicotine chronic treatments on sperm parameters and testis histological features of rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2014: 218293.
- Chong, C.T., Lai, W.K., Sallehuddin, S.M. & Ganapathy, S.S. 2023. Prevalence of overweight and its associated factors among Malaysian adults: Findings from a nationally representative survey. *PLoS ONE* 18(8): e0283270.
- Darand, M., Hajizadeh, M., Mirmiran, P. & Mokari-Yamchi, A. 2019. The effect of *Nigella sativa* on infertility in men and women: A systematic review. *Progr. Nutr.* 21(2-S): 33-41.
- Dorostghoal, M., Kazeminejad, S.R., Shahbazian, N., Pourmehdi, M. & Jabbari, A. 2017. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia* 49(10): e12762.
- Duale, N., Steffensen, I.L., Andersen, J., Brevik, A., Brunborg, G. & Lindeman, B. 2014. Impaired sperm chromatin integrity in obese mice. *Andrology* 2(2): 234-243.
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K. & Kumar, D.S. 2016. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness* 5(2): 49-56.
- Huang, C.-J., McAllister, M.J., Slusher, A.L., Webb, H.E., Mock, J.T. & Acevedo, E.O. 2015. Obesity-related oxidative stress: The impact of physical activity and diet manipulation. *Sports Medicine - Open* 1: 32.
- Hug, E., Villeneuve, P., Bravard, S., Chorfa, A., Damon-Soubeyrand, C., Somkuti, S.G., Moazamian, A., Aitken, R.J., Gharagozloo, P., Drevet, J.R. & Saez, F. 2023. Loss of nuclear/DNA integrity in mouse epididymal spermatozoa after short-term exposure to low doses of dibutyl phthalate or bisphenol AF and its mitigation by oral antioxidant supplementation. *Antioxidants* 12(5): 1046.
- Hungerford, A.J., Bakos, H.W. & Aitken, R.J. 2024. Addition of vitamin C mitigates the loss of antioxidant capacity, vitality and DNA integrity in cryopreserved human semen samples. *Antioxidants* 13(2): 247.
- Iommiello, V.M., Albani, E., Di Rosa, A., Marras, A., Menduni, F., Morreale, G., Levi, S.L., Pisano, B. & Levi-Setti, P.E. 2015. Ejaculate oxidative stress is related with sperm DNA fragmentation and round cells. *International Journal of Endocrinology* 2015: 321901.
- Kamalrudin, A., Jasamai, M. & Mat Noor, M. 2018. Ameliorative effect of *Moringa oleifera* fruit extract on reproductive parameters in diabetic-induced male rats. *Pharmacognosy Journal* 10(6s): s54-s58.
- Kamar Bashah, N.A. & Mat Noor, M. 2021. Antihyperglycemic and androgenic properties of *Moringa oleifera* leaves aqueous extract attenuate sexual dysfunction in diabetes-induced male rats. *Malaysian Applied Biology* 50(2): 99-105.
- Katimbwa, D.A., Oh, J., Jang, C.H. & Lim, J. 2022. Orlistat, a competitive lipase inhibitor used as an antiobesity remedy, enhances inflammatory reactions in the intestine. *Applied Biological Chemistry* 65: 47.
- Leisegang, K., Almaghrawi, W. & Henkel, R. 2021. The effect of *Nigella sativa* oil and metformin on male seminal parameters and testosterone in Wistar rats exposed to an obesogenic diet. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 133: 111085.
- Leisegang, K., Sengupta, P., Agarwal, A. & Henkel, R. 2021. Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrologia* 53(1): e13617.
- Leong, X-F., Rais Mustafa, M. & Jaarin, K. 2013. *Nigella sativa* and its protective role in oxidative stress and hypertension. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 120732.
- Mat Noor, M., Mohamad Zin, N.F.A. & Shamsusah, N.A. 2023. Keberkesanan ekstrak akua kaliks *Hibiscus sabdariffa* sebagai agen anti-obesiti dan peningkat parameter kesuburan tikus jantan aruhan obesiti. *Malaysian Applied Biology* 52(6): 137-147.
- Ododo, A., Ojeka, S.O. & Dapper, V.D. 2019. Ameliorative effect of aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* on reproductive function following cadmium chloride induced oxidative stress in male Wistar rats. *Notulae Scientia Biologicae* 11(4): 352-357.

- Pourmasumi, S., Tabibnejad, N., Reza Talebi, A. & Talebi, A.R. 2017. The etiologies of sperm DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *Int. J. Reprod. BioMed.* 15(6): 331-344.
- Palaniappan, K. 2023. *Male Infertility on the Rise*. Sunway Fertility Centre.
- Rashki Ghaleno, L., Alizadeh, A., Drevet, J.R., Shahverdi, A. & Valojerdi, M.R. 2021. Oxidation of sperm DNA and male infertility. *Antioxidants* 10(1): 97.
- Sepidarkish, M., Maleki-Hajiagha, A., Maroufizadeh, S., Rezaeinejad, M., Almasi-Hashiani, A. & Razavi, M. 2020. The effect of body mass index on sperm DNA fragmentation: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Obesity* 44(3): 549-558.
- Sheikh, T.J., Joshi, D.V. & Patel, B.J. 2013. Protective role of *Nigella sativa* against experimentally induced type-II diabetic nuclear damage in Wistar rats. *Veterinary World* 6(9): 698-702.
- Stoyanova, N., Spasova, M., Manolova, N., Rashkov, I., Georgieva, A. & Toshkova, R. 2020. Antioxidant and antitumor activities of novel quercetin-loaded electrospun cellulose acetate/polyethylene glycol fibrous materials. *Antioxidants* 9(3): 232.
- Suleiman, J.B., Nna, V.U., Othman, Z.A., Zakaria, Z., Bakar, A.B.A. & Mohamed, M. 2020. Orlistat attenuates obesity-induced decline in steroidogenesis and spermatogenesis by up-regulating steroidogenic genes. *Andrology* 8(5): 1471-1485.
- Susanto, H., Taufiq, A., Sunaryono, Imam Mawardi, A., Hariyanto, Y.A., Nicholas Gerry, A., Tri Yunisa, D., Rufiandita, F., Faris, Nizarghazi, Alifi, G., Lita Neldya, P., Sinta Dewi, M. & Sumardi. 2019. The characterization of green materials of *Moringa oleifera* leaf powder (MOLP) from Madura Island with different preparation methods. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 276: 012005.
- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Liew, W-P.P. & Sulaiman Rahman, H. 2018. Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in Pharmacology* 9: 1162.
- Tüfek, N.H., Altunkaynak, M.E., Altunkaynak, B.Z. & Kaplan, S. 2015. Effects of thymoquinone on testicular structure and sperm production in male obese rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 61(4): 194-204.
- Vander Borgh, M. & Wyns, C. 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry* 62: 2-10.
- Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M.M. & Fernandez, M.L. 2017. Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. *Antioxidants (Basel)* 6(4): 91.
- Wisevoter. 2023. *Obesity Rates by Country*. <https://wisevoter.com/country-rankings/obesity-rates-by-country/>
- Yang, F.L., Wei, Y.X., Liao, B.Y., Wei, G.J., Qin, H.M., Pang, X.X. & Wang, J.L. 2020. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in obese mice. *Frontiers in Pharmacology* 11: 742.
- Yang, H., Li, G., Jin, H., Guo, Y. & Sun, Y. 2019. The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Translational Andrology and Urology* 8(4): 356-365.
- Yi, X., Tang, D., Cao, S., Li, T., Gao, H., Ma, T., Yao, T., Li, J. & Chang, B. 2020. Effect of different exercise loads on testicular oxidative stress and reproductive function in obese male mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020: 3071658.
- Zade, V.S., Dabhadkar, D.K., Thakare, V.G. & Pare, S.R. 2013. Effect of aqueous extract of *Moringa oleifera* seed on sexual activity of male Abino rats. *Biological Forum - An International Journal* 5(1): 129-140.

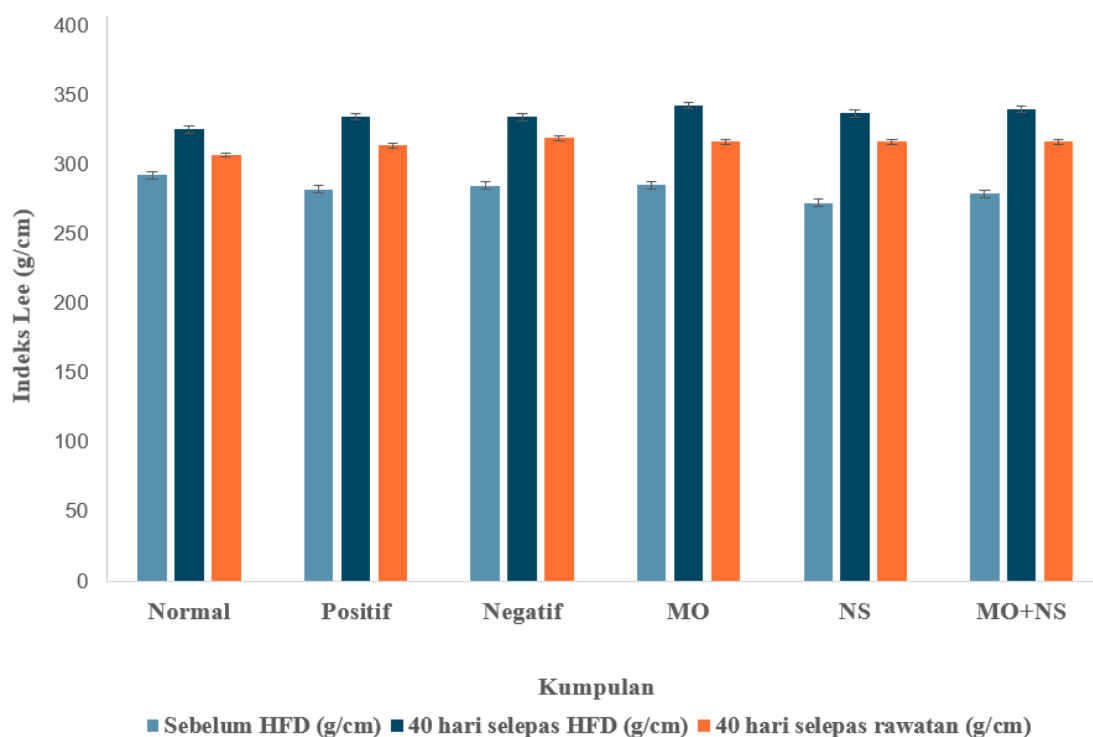
\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: mahanem@ukm.edu.my

## ANALISIS INDEKS LEE TIKUS

Rajah S1 menunjukkan graf bar purata indeks Lee bagi kumpulan kawalan dan juga kumpulan rawatan sebelum pengambilan HFD, 40 hari selepas pengambilan HFD dan 40 hari selepas tamat tempoh rawatan. Berdasarkan Rajah S1, dilihat bahawa meskipun tikus daripada kumpulan kawalan normal tidak menerima HFD, namun berlaku peningkatan indeks Lee sehingga mencapai tahap obes  $\geq 310$ . Ini berlaku mungkin disebabkan oleh pemberian makanan secara *ad libitum* yang membenarkan tikus kumpulan normal mengamalkan diet pemakanan pelet secara tanpa kawalan sekali gus mengakibatkan peningkatan berat badan dengan masa. Bagi tikus kumpulan kawalan positif yang menerima dos orlistat 10 mg/kg/hari, indeks Lee tikus menunjukkan penurunan yang signifikan ( $p < 0.05$ ) daripada  $334.65 \pm 16.73$  kepada  $313.72 \pm 15.69$ . Ini membuktikan bahawa orlistat berjaya bertindak sebagai perencat lipase gastrik dan pankreas dalam mengurangkan penyerapan lemak dalam badan (Katimbwa et al. 2022). Namun, penurunan ini masih mengekalkan tikus dalam kategori obes kerana nilai indeks Lee masih mencecah  $\geq 310$ . Manakala bagi tikus kumpulan rawatan MO400, nilai indeks Lee juga menurun

dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) daripada  $342.49 \pm 17.12$  kepada  $316.27 \pm 15.81$  selepas rawatan. Ini membuktikan bahawa intervensi herba MO dapat membantu dalam pembakaran lemak badan bagi tikus yang diaruh obesiti. Manakala bagi tikus kumpulan rawatan NS200 dan MO400+NS200, kedua-duanya menunjukkan penurunan peratusan indeks Lee yang hampir sama selepas rawatan selama 40 hari iaitu masing-masing 6.28 dan 7.19 (Jadual S1).

Berdasarkan analisis statistik ANOVA, hasil penilaian menunjukkan bahawa penurunan indeks Lee antara selepas HFD berbanding selepas rawatan menunjukkan penurunan yang signifikan ( $p < 0.05$ ) pada setiap kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan. Namun, hasil analisis menunjukkan bahawa jika dibandingkan penurunan indeks Lee antara kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan, peratusan penurunan indeks Lee tidak signifikan ( $p > 0.05$ ). Meskipun perbezaan penurunan indeks Lee antara kumpulan rawatan tidak signifikan, intervensi orlistat (10 mg/kg), MO400, NS200 dan MO400+NS200 tetap berupaya menjalankan mekanisme masing-masing secara seiring dalam usaha mengurangkan pемendapan lemak dalam badan dan akhirnya membawa kepada penurunan berat badan tikus jantan aruhan-obesiti.



RAJAH S1. Purata nilai indeks Lee bagi kumpulan kawalan dan kumpulan rawatan MO, NS, dan MO+NS sebelum HFD, 40 hari selepas HFD dan 40 hari selepas rawatan

JADUAL S1. Kesan rawatan MO, NS dan MO+NS terhadap indeks Lee tikus yang diaruh obesiti berbanding kumpulan kawalan

Kumpulan	Sebelum HFD (g/cm)	40 hari selepas HFD (g/cm)	40 hari selepas rawatan (g/cm)	Peratusan penurunan indeks Lee (%)
Normal	292.42±14.62	325.17±16.26	306.89±15.34	5.78
Positif	282.33±14.12	334.65±16.73	313.72±15.69	6.46
Negatif	284.84±14.24	334.11±16.70	319.18±15.96	4.57
MO	285.17±14.26	342.49±17.12	316.27±15.81	7.96
NS	272.46±13.62	336.90±16.84	316.37±15.82	6.28
MO+NS	278.90±13.95	339.91±17.00	316.31±15.82	7.19