

Tindakan Minyak Kelapa Dara terhadap Tulang Osteoporosis Pascamenopaus: Analisis Gen Osteoblastogenesis dan Antioksidan

(The Effects of Virgin Coconut Oil on Postmenopausal Osteoporotic Bone:
Analyses on Osteoblastogenesis and Antioxidant Genes)

SHIDQIYAH ABDUL-HAMID, NORLIZA MUHAMMAD* & ISA NAINA MOHAMED

ABSTRAK

Osteoporosis pascamenopaus merupakan salah satu masalah kesihatan utama yang melanda kaum wanita berumur. Ia disebabkan oleh beberapa faktor termasuk tekanan oksidatif, yang dipercayai dapat dikawal melalui pengambilan antioksidan daripada sumber makanan. Minyak kelapa dara (VCO) merupakan salah satu hasil semula jadi yang kaya dengan antioksidan dan telah dibuktikan mampu memelihara tulang yang mengalami osteoporosis. Kajian ini dijalankan untuk mendapatkan kefahaman yang lebih mendalam tentang aktiviti minyak kelapa dara terhadap osteoporosis pada peringkat molekular. Tiga puluh dua ekor tikus betina Sprague-Dawley dibahagikan kepada empat kumpulan, iaitu kumpulan pembedahan Sham, kawalan terovariektomi (Ovx+Ctrl), kumpulan terovariektomi dengan rawatan VCO (Ovx+VCO) dan kumpulan terovariektomi dengan rawatan estrogen (Ovx+E). Kesemua rawatan diberikan melalui oral selama sepuluh minggu. Sampel tulang femur tikus diambil untuk mengkaji perubahan pada ekspresi gen superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GPX), osteokalsin dan transkripsi faktor 2 berkaitan run (Runx2). Hasil kajian mendapati bahawa tikus yang menerima rawatan VCO mengalami peningkatan yang signifikan pada ekspresi gen SOD, GPX dan osteokalsin berbanding kumpulan kawalan terovariektomi, disamping ekspresi gen Runx2 yang turut menunjukkan pola peningkatan. Secara kesimpulannya, VCO membantu memelihara tulang pada tikus model osteoporosis melalui tindakannya meningkatkan ekspresi gen antioksidan serta gen yang meningkatkan aktiviti sel osteoblas.

Kata kunci: Minyak kelapa dara; model tikus terovariektomi; osteoporosis; pascamenopaus

ABSTRACT

Postmenopausal osteoporosis is one of the main health problems in aging women. It was due to several factors including oxidative stress, which can be controlled through intake of antioxidants from food sources. Virgin coconut oil (VCO) is one of the natural product rich in antioxidants and has been proven to protect osteoporotic bone. This study was conducted to gain in-depth understanding on virgin coconut oil's activity on osteoporosis at molecular level. Thirty two female Sprague-Dawley rats were divided into four groups, namely Sham operated group, ovariectomized control group (Ovx+Ctrl), ovariectomized with VCO treatment (Ovx+VCO), and ovariectomized with estrogen treatment (Ovx+E). All treatments were administered orally for ten weeks. Bone samples were obtained to examine changes on expression of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), osteocalcin and runt-related transcription factor 2 (Runx2) genes. The results indicated that rats receiving VCO treatment had experienced significant increments in SOD, GPX and osteocalcin gene expressions compared to the ovariectomized control group, besides the gene expressions of Runx2 which also showed an increment pattern. In conclusion, VCO helps to protect bone in osteoporotic rat model by increasing the expressions of antioxidant genes and genes which increase the osteoblast activities.

Keywords: Osteoporosis; ovariectomized rat model; postmenopausal; virgin coconut oil

PENGENALAN

Osteoporosis merupakan penyakit metabolisme tulang paling utama yang lazimnya berlaku dalam kalangan warga tua. Ia terjadi apabila terdapat gangguan pada keseimbangan kadar tukar ganti tulang yang mengakibatkan tulang menjadi rapuh (Novack & Faccio 2011; Wu et al. 2010). Mereka yang mengalami masalah sistemik tulang ini mempunyai tulang yang lemah serta terdedah kepada risiko patah tulang (Aggarwal et al. 2011; Eastell 2013). Osteoporosis pascamenopaus yang dialami

oleh wanita merupakan osteoporosis yang paling kerap direkodkan, serta menjadi antara masalah kesihatan yang utama (Kaveh et al. 2010; Riggs et al. 2002) both E and testosterone T. Di Malaysia, dilaporkan bahawa sebanyak 42.1% wanita pascamenopaus dan 11.1% pramenopaus mengalami osteoporosis pascamenopaus (Lim et al. 2005). Osteoporosis jenis ini terjadi akibat perubahan fisiologi normal wanita menopause yang mengalami penurunan aras hormon estrogen dalam badan (Almeida 2010; Raisz 2005; Weatherholt et al. 2012).

Kajian terdahulu telah membuktikan osteoporosis dan kekurangan hormon estrogen berkait rapat dengan peroksidasi lipid yang membebaskan radikal-radikal bebas (Bellanti et al. 2013; Manolagas 2010). Kadar radikal bebas yang tinggi akan menggalakkan aktiviti sel osteoklas yang akhirnya membawa kepada kerosakan struktur tulang, di samping mengganggu aktiviti sel osteoblas (Arai et al. 2007; Baek et al. 2010; Lean et al. 2003; Manolagas 2010). Osteoporosis akan terjadi sekiranya aktiviti sel osteoklas melebihi proses pembentukan tulang baru oleh sel osteoblas. Walau bagaimanapun, tindakan radikal bebas ini dapat dihalang oleh molekul antioksidan dalam badan seperti enzim superoksida dismutase (SOD) dan glutathion peroksida (GPX) (Behfar et al. 2008; Sen et al. 2010). Osteoporosis merendahkan SOD dan GPX sebagai mana yang dapat dilihat pada haiwan terovariektomi (Abujazia et al. 2012; Muthusami et al. 2005; Rendina et al. 2013) dan juga wanita-wanita yang mengalami osteoporosis pascamenopaus (Maggio et al. 2003; Oveisi et al. 2011; Sánchez-Rodríguez et al. 2007).

Sel osteoblas mensintesis osteokalsin, iaitu protein tak-terkolagen yang utama pada matriks tulang. Kandungan osteokalsin di dalam tulang akan menurun sekiranya proses osteoblastogenesis dan fungsi osteoblas terencat. Ini membolehkan osteokalsin digunakan sebagai pengukur atau penanda bagi fungsi osteoblast. Ekspresi osteokalsin dikawal-selia oleh gen transkripsinya iaitu *runt-related transcription factor 2* (Runx2). Selain meningkatkan ekspresi osteokalsin oleh osteoblas, gen ini juga bertindak sebagai pengawal dan pencetus proses osteogenesis, seterusnya meningkatkan diferensiasi sel osteoblas (Cao et al. 2005; Zhang et al. 2011). Beberapa penyelidik juga telah menunjukkan aras ekspresi gen Runx2 berkadar terus dengan ekspresi beberapa gen penanda fungsi osteoblas seperti osteokalsin dan osteopontin (Xiao et al. 1998)

Mutakhir ini, kajian mengenai kebaikan antioksidan dalam tumbuhan semula jadi serta kesannya terhadap kesihatan tulang semakin banyak dijalankan. Vitamin E, C, karotenoid dan polifenol merupakan antara antioksidan yang biasanya diperolehi daripada sumber makanan. Antara kumpulan antioksidan ini, polifenol merupakan yang paling banyak dikaji untuk melihat kesannya ke atas tulang (Duthie et al. 2000; Rao et al. 2012). Polifenol dalam tumbuhan didapati memberi kesan positif terhadap osteoporosis melalui tindakannya ke atas sel osteoblas dan osteoklas. Antara sumber tumbuhan yang dimaksudkan termasuklah minyak zaitun (Puel et al. 2004), teh hijau (Shen et al. 2008), plum kering (Bu et al. 2009) serta minyak kelapa dara (Abujazia et al. 2012; Hayatullina et al. 2012).

Minyak kelapa dara (VCO) merupakan hasil tumbuhan yang kaya dengan antioksidan seperti polifenol, vitamin, sterol dan tokoferol (Arunima & Rajamohan 2012; Kamariah et al. 2008; Mansor et al. 2012). Pelbagai kajian telah dijalankan untuk melihat kesan minyak ini kepada kesihatan. Secara amnya, antioksidan dalam VCO membantu dengan meningkatkan kandungan antioksidan dalam darah serta menghalang pembentukan lipid

peroksida dalam sel (Nevin & Rajamohan 2010, 2008, 2006).

Dalam tisu tulang, kajian sebelum ini telah menunjukkan bahawa selain meningkatkan aktiviti antioksidan, VCO juga mampu menghalang kelesapan jisim tulang serta membaiki struktur tulang yang mengalami osteoporosis (Abujazia et al. 2012; Hayatullina et al. 2012). Sungguhpun begitu, tindakan sebenar VCO ini pada peringkat molekular masih belum dapat dijelaskan. Oleh yang demikian, kajian ini dijalankan bertujuan mengetahui tindakan VCO ke atas beberapa gen antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD) dan glutathion peroksidas (GPX). Selain itu, ekspresi gen osteokalsin dan *runt-related transcription factor 2* (Runx2) yang terlibat dengan aktiviti sel osteoblas turut diteliti dalam kajian ini. Dengan melihat tindak balas gen-gen ini, kita akan dapat mengenal pasti mekanisme anti-osteoporosis pada minyak kelapa dara, dari sudut kesannya terhadap aktiviti antioksidan serta aktiviti sel osteoblas.

BAHAN DAN KAEDAH

Kajian dijalankan dengan menggunakan 32 ekor tikus *Sprague Dawley* betina yang beratnya sekitar 200-250 gm semasa diterima. Haiwan ini diperolehi dari Unit Sumber Haiwan Makmal (LARU), Universiti Kebangsaan Malaysia. Tikus diletakkan dua ekor dalam setiap sangkar beralaskan habuk kayu di bawah kitaran 12 jam cerah dan gelap. Tikus kemudiannya dibahagikan secara rawak kepada empat kumpulan. Kumpulan-kumpulan tersebut ialah kumpulan pembedahan Sham, kumpulan kawalan terovariektomi (Ovx+Ctrl), kumpulan terovariektomi dengan rawatan minyak kelapa dara (Ovx+VCO) serta kumpulan terovariektomi dengan rawatan estrogen (Ovx+E).

Rawatan dimulakan dua minggu selepas pembedahan ovariektomi dijalankan. Rawatan diberikan melalui oral dan kesemua tikus menerima rawatan pada waktu yang sama setiap hari selama sepuluh minggu. Tikus kumpulan Ovx+VCO dan Ovx+E masing-masing menerima dos 64.5 µg/kg dan 3 mL/kg berat badan. Bagi tikus kumpulan Sham dan Ovx+Ctrl pula, haiwan diberikan air ternyahion sebanyak 3 mL/kg sehari sebagai sarana. Di akhir tempoh rawatan, haiwan dikorbankan dan tulang femur kanan diambil untuk tujuan analisis gen. Kajian telah diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan, Universiti Kebangsaan Malaysia.

DIET DAN RAWATAN

Sepanjang tempoh rawatan, kesemua tikus dibekalkan dengan makanan ('rat chow', Gold Coin, Selangor Malaysia) dan air secara *ad libitum*. Minyak kelapa dara yang digunakan dalam kajian ini telah dibekalkan oleh Biococo Marketing, Selangor. Dos VCO yang dipilih adalah berdasarkan dos harian yang disyorkan untuk orang dewasa iaitu sebanyak 30 mL sehari (Liau et al. 2011). Dos ini kemudiannya diterjemahkan kepada dos untuk tikus

dengan menggunakan formula dos setara manusia (HED) (Reagan-Shaw et al. 2007) it is essential to appropriately translate the drug dosage from one animal species to another. A misunderstanding appears to exist regarding the appropriate method for allometric dose translations, especially when starting new animal or clinical studies. The need for education regarding appropriate translation is evident from the media response regarding some recent studies where authors have shown that resveratrol, a compound found in grapes and red wine, improves the health and life span of mice. Immediately after the online publication of these papers, the scientific community and popular press voiced concerns regarding the relevance of the dose of resveratrol used by the authors. The animal dose should not be extrapolated to a human equivalent dose (HED). Bagi rawatan estrogen pula, tablet Premarin® (Wyeth Pharmaceuticals) digunakan untuk penyediaan rawatan. Setiap tablet Premarin mengandungi 0.625 mg estrogen berkonjugat. Tablet dihancurkan dan dilarutkan dalam air ternyahan. Kesemua rawatan diberikan melalui oral.

PENENTUAN EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN DAN OSTEOBLASTOGENESIS

5 mg tisu diambil dari bahagian distal tulang femur untuk dihomogenkan. 303 µL campuran larutan penghomogenan dan proteinase K (Panomics, Fremont, CA) dicampurkan ke dalam tiub ruptur dengan manik logam bersama dengan sampel tulang dan dihomogenkan selama 15-30 s, untuk dua pusingan. Tiub kemudian dieram dalam rendaman air pada suhu 65°C selama 60 min sebelum diempar pada 13000 rpm selama 10 min pada suhu bilik. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam plat 96 telaga untuk mengukur ekspresi gen.

Kesemua aras mRNA gen yang dikaji diukur menggunakan kit asai QuantiGene Plex 2.0 (Panomics, Fremont, CA), yang menggunakan gabungan teknologi amplifikasi signal *branched* DNA (bdNA) dan manik xMAP Luminex. Kesemua set prob bagi mRNA yang dikaji direka bentuk dan disintesis oleh Panomics untuk mengesan gen osteokalsin (NM_013414), Runx2 (XM_3346016), SOD1/CuZnSOD (NM_017050) dan Gpx1 (NM_030826). GAPDH (NM_017008) digunakan sebagai gen penormalan. Kaedah analisis dijalankan mengikut panduan yang telah disediakan.

Secara ringkas, manik penangkap yang menangkap molekul RNA secara spesifik dicampurkan ke dalam lisat sampel dalam piring sebelum diinkubasi semalaman bersama prob-prob sintetik untuk penghibridan mRNA sasaran. Kemudian, molekul amplifikasi signal dan prob label ditambah kepada manik penangkap. Akhir sekali, manik diinkubasi dengan *streptavidin-conjugated R-phycoerythrin* (SAPE) yang akan bercantum pada prob label untuk menghasilkan pendarfluor bagi setiap mRNA yang dikaji. Sampel kemudiannya dibaca menggunakan instrumen Luminex (Luminex, Austin, TX) dengan perisian MasterPlex CT (Hitachi Solution, San Francisco, CA) untuk

membaca aras ekspresi gen. Kesemua data ternormal kepada GAPDH mRNA dan diungkapkan dalam unit *median fluorescent intensity* (MFI).

ANALISIS STATISTIK

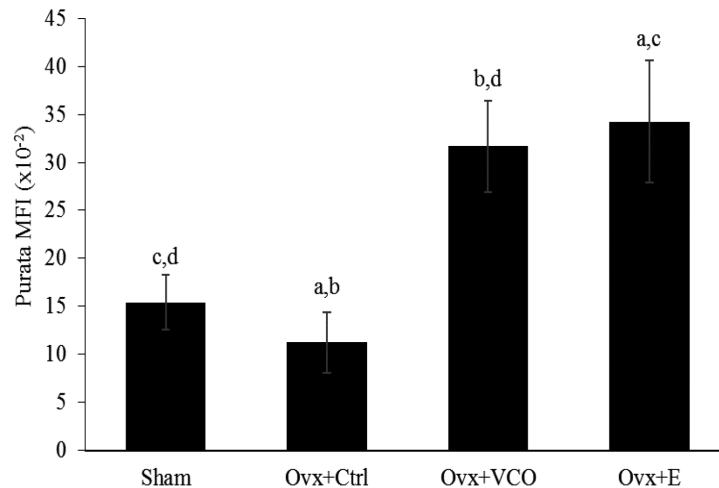
Analisis statistik dijalankan menggunakan perisian IBM SPSS Statistics versi 20.0 (IBM Corp, Armonk, NY). Kenormalan data diuji menggunakan ujian Kolmogorov-Smirnov. Kemudian, ujian analisis varians (ANOVA) dijalankan bagi menentukan sekiranya terdapat perbezaan yang signifikan pada aras ekspresi gen antara kumpulan yang berbeza. Aras keertian ditetapkan pada $p < 0.05$.

HASIL DAN PERBINCANGAN

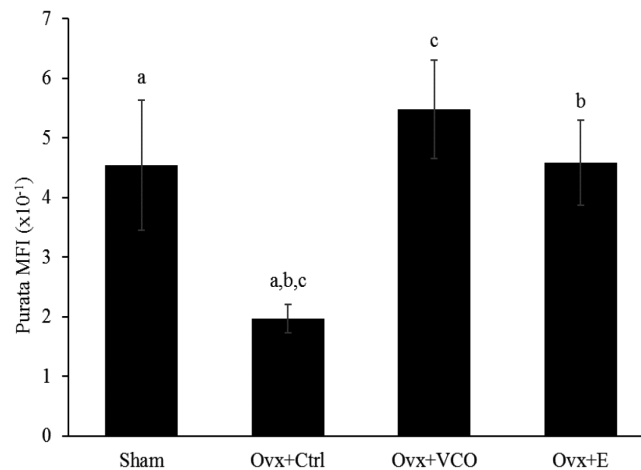
KESAN INTERVENSI TERHADAP EKSPRESI GEN BERKAITAN ANTIOKSIDAN

Kajian ini melihat kepada ekspresi mRNA enzim antioksidan superoksida dismutase (SOD) dan glutathion peroksidase (GPX). Rajah 1 menunjukkan perbezaan ekspresi SOD bagi setiap kumpulan rawatan dengan mRNA *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* GAPDH sebagai gen penormalan. Terdapat perbezaan yang signifikan antara kumpulan dan peningkatan yang signifikan adalah pada kumpulan tikus OvX+VCO dan OvX+E berbanding kumpulan OvX+Ctrl dan Sham. Bagi ekspresi mRNA GPX, ujian statistik menunjukkan terdapat perbezaan yang signifikan, iaitu kumpulan kawalan OvX+Ctrl mencatatkan ekspresi mRNA yang lebih rendah berbanding tiga kumpulan yang lain (Rajah 2). Manakala tiada perbezaan yang signifikan antara kumpulan Sham, OvX+E dan OvX+VCO.

Secara umum, hasil kajian menunjukkan tikus kumpulan OvX+Ctrl mengalami penurunan yang signifikan bagi ekspresi mRNA antioksidan SOD dan GPX berbanding kumpulan OvX+VCO dan OvX+E. Peningkatan aras ekspresi mRNA antioksidan ini pada tikus yang menerima rawatan VCO dan estrogen mencadangkan bahawa kedua-dua rawatan ini berpotensi meningkatkan kadar antioksidan dalam badan tikus yang mengalami fasa menopause. Kedua-dua rawatan ini juga didapati mampu meningkatkan paras antioksidan melebihi paras antioksidan pada tikus Sham dewasa yang melalui proses penuaan semula jadi. Keputusan ini adalah selari dengan kajian Abujazia et al. (2012) yang mendapati bahawa enzim antioksidan GPX meningkat secara signifikan di dalam tisu tulang setelah pemberian VCO pada tikus terovarietomi. Malah, enzim SOD turut menunjukkan sedikit peningkatan berbanding kumpulan ovarietomi kawalan dalam kajian tersebut. Di samping itu, dengan membandingkan kesan rawatan VCO dan estrogen dalam kajian ini, didapati bahawa tidak terdapat sebarang perbezaan yang signifikan pada ekspresi mRNA SOD dan GPX bagi kedua-dua kumpulan. Akan tetapi, tikus OvX+E menunjukkan ekspresi mRNA GPX yang lebih



RAJAH 1. Kesan rawatan minyak kelapa dara ke atas ekspresi mRNA SOD. Data dinyatakan sebagai 'median fluorescence intensity' MFI (purata \pm SEM) ($n=8$), ternormal kepada GAPDH. Huruf yang sama menandakan terdapat perbezaan ekspresi gen yang signifikan antara kumpulan ($p<0.05$)



RAJAH 2. Kesan rawatan minyak kelapa dara ke atas ekspresi mRNA GPX. Data dinyatakan sebagai 'median fluorescence intensity' MFI (purata \pm SEM) ($n=8$), ternormal kepada GAPDH. Huruf yang sama menandakan terdapat perbezaan ekspresi gen yang signifikan antara kumpulan ($p<0.05$)

rendah berbanding tikus Ovx+VCO dan ini mencadangkan bahawa rawatan VCO meningkatkan aktiviti antioksidan tikus secara seimbang berbanding dengan rawatan estrogen.

Tikus terovariotomi merupakan haiwan yang sering digunakan sebagai model untuk mengkaji osteoporosis pascamenopaus (Jee 1995; Lelovas et al. 2008; Miller et al. 1995). Dalam kajian ini, ovariektomi bilateral, iaitu pembuangan kedua belah ovari telah dilakukan ke atas tikus untuk menyerupai keadaan wanita menopaus yang mengalami kekurangan hormon estrogen dan peningkatan proses peroksidaan lipid pada tulang yang membawa kepada tekanan oksidatif (Høegh-Andersen et al. 2004; Jagger et al. 2005; Muthusami et al. 2005). Tekanan oksidatif menjadi salah satu faktor yang perlu diperhatikan semasa mengkaji patogenesis osteoporosis pascamenopaus kerana ia memainkan peranan penting

kepada fungsi dan pembahagian sel osteoklas (Manolagas 2010). Oleh itu, kajian dilakukan untuk melihat tahap ekspresi gen antioksidan SOD dan GPX bagi menentukan kesan ovariektomi serta rawatan yang diberikan kepada tikus yang mengalami tekanan oksidatif.

Antioksidan merupakan bahan kimia yang mampu menghalang proses pengoksidaan serta penghasilan beberapa spesies radikal bebas oksigen (Behfar et al. 2008). Molekul antioksidan yang dihasilkan dalam tubuh manusia (juga disebut sebagai antioksidan endogenus) ataupun eksogenus yang diperoleh dari sumber tumbuhan bertindak meneutralkan radikal bebas serta melindungi badan daripada penyakit yang disebabkan oleh kerosakan tisu (Sen et al. 2010). VCO mempunyai kandungan antioksidan seperti polifenol yang tinggi berbanding minyak kelapa biasa (Dia et al. 2005). Ia telah terbukti mampu menghalang penghasilan lipid peroksida yang

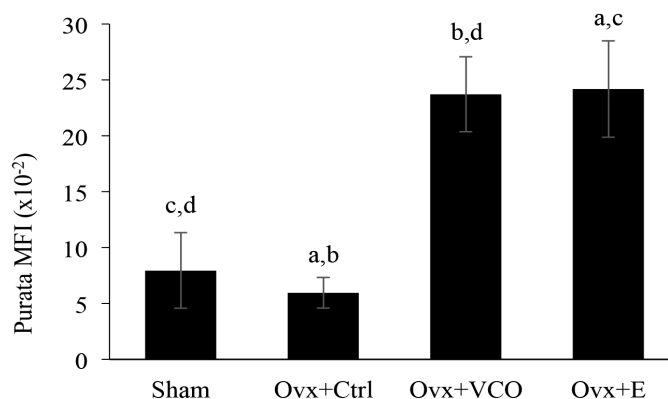
menjadi salah satu penyebab kepada osteoporosis (Marina et al. 2009; Nevin & Rajamohan 2006). Keputusan kajian ini telah membuktikan bahawa VCO dapat meningkatkan aktiviti antioksidan SOD dan GPX yang bertindak menghalang aktiviti radikal bebas dalam badan. Selain VCO, polifenol daripada teh hijau turut meningkatkan aktiviti GPX dalam tisu hati tikus terovariektomi (Shen et al. 2008).

KESAN INTERVENSI TERHADAP EKSPRESI GEN BERKAITAN OSTEOLASTOGENESIS

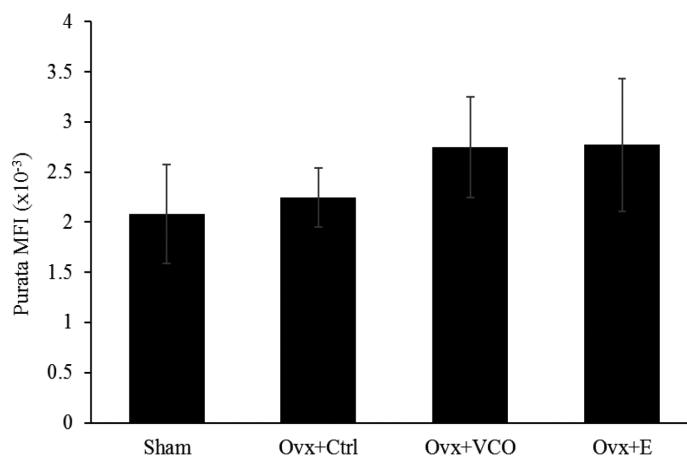
Bagi mengkaji kesan rawatan VCO terhadap aktiviti osteoblastogenesis, kajian ini telah melihat kepada perbezaan ekspresi mRNA osteokalsin dan Runx2 dengan mRNA GAPDH sebagai kawalan. Perbezaan ekspresi mRNA osteokalsin ditunjukkan pada Rajah 3. Terdapat perbezaan yang signifikan antara kumpulan rawatan, iaitu kumpulan OvX+VCO dan OvX+E didapati mempunyai aras mRNA osteokalsin yang lebih tinggi berbanding tikus OvX+Ctrl dan Sham. Rajah 4 pula menunjukkan purata ekspresi mRNA Runx bagi setiap kumpulan rawatan. Tidak terdapat

sebarang perbezaan yang signifikan pada aras ekspresi gen ini antara kesemua kumpulan rawatan dan kawalan. Akan tetapi, kedua-dua kumpulan OvX+VCO dan OvX+E menunjukkan pola peningkatan pada ekspresi gen Runx2 ini jika dibandingkan dengan kumpulan kawalan Sham serta OvX+Ctrl.

Kajian oleh Hayatullina et al. (2012) sebelum ini telah membuktikan kemampuan VCO dalam mengekalkan struktur tulang yang sihat pada tikus terovariektomi. Justeru, untuk memastikan kesan tindakan VCO kepada proses formasi tulang pada peringkat molekular, kajian ini telah meneliti ekspresi mRNA bagi gen yang mengawal osteokalsin dan Runx2. Serum osteokalsin menjadi penanda bukan sahaja untuk formasi tulang, tetapi juga untuk proses tukar ganti tulang. Ini kerana osteokalsin yang terdapat pada mineral hidroksiapatit tulang akan dilepaskan ke dalam sistem peredaran darah sewaktu kedua-dua fasa formasi dan resorpsi tulang berlaku (Naylor & Eastell 2012). Oleh itu, ovariektomi turut meningkatkan aras serum osteokalsin pada tikus yang menandakan berlaku peningkatan pada proses tukar ganti



RAJAH 3. Kesan rawatan minyak kelapa dara ke atas ekspresi mRNA osteokalsin. Data dinyatakan sebagai 'median fluorescence intensity' MFI (purata \pm SEM) ($n=8$), ternormal kepada GAPDH. Huruf yang sama menandakan terdapat perbezaan ekspresi gen yang signifikan antara kumpulan ($p<0.05$)



RAJAH 4. Kesan rawatan minyak kelapa dara ke atas ekspresi mRNA Runx2. Data dinyatakan sebagai 'median fluorescence intensity' MFI (purata \pm SEM) ($n=8$), ternormal kepada GAPDH

tulang (Puel et al. 2004; Yarrow et al. 2008; Yoon et al. 2012).

Peningkatan pada ekspresi gen osteokalsin selepas pemberian VCO membuktikan bahawa rawatan tersebut menggalakkan pertumbuhan tulang. Kajian terdahulu menunjukkan terdapat beberapa percanggahan dalam keputusan kajian mengenai kesan polifenol terhadap osteokalsin. Pemberian plum kering kepada tikus terovarietomi tidak menunjukkan sebarang perubahan yang signifikan pada kedua-dua ekspresi gen serta aras serum osteokalsin (Franklin et al. 2006; Rendina et al. 2013). Akan tetapi, kajian menggunakan beri biru pula meningkatkan kedua-duanya (Chen et al. 2010). Di samping itu, polifenol daripada teh hijau dan minyak zaitun turut meningkatkan serum osteokalsin (Puel et al. 2004; Shen et al. 2011).

Runx2 merupakan faktor transkripsi penting untuk perkembangan sel-sel osteoblas (Datta et al. 2008; Gaur et al. 2005) tissue-specific transcriptional mechanisms through which WNT signaling promotes the differentiation of bone-forming cells have yet to be identified. Here, we address the hypothesis that canonical WNT signaling and the bone-related transcription factor RUNX2/CBFA1/AML3 are functionally linked components of a pathway required for the onset of osteoblast differentiation. Our findings show that, in bone of the SFRP1 (secreted frizzled-related protein-1). Pendedahan sel osteoblas tikus (MC3T3-E1) kepada tekanan oksidatif merendahkan ekspresi mRNA Runx2 serta kadar pemineralan pada sel (Arai et al. 2007). Pemberian polifenol daripada tumbuhan kepada sel yang sama pula dikatakan dapat meningkatkan semula ekspresi mRNA Runx2 (Bu et al. 2009). Di samping itu, tikus yang diberikan beri biru yang kaya dengan polifenol turut menunjukkan peningkatan pada aras mRNA Runx2 pada tisu tulang (Chen et al. 2010). Dalam kajian ini, kedua-dua rawatan VCO dan estrogen dilihat dapat meningkatkan ekspresi gen Runx2 walaupun perbezaannya tidak signifikan berbanding tikus Ovx+Ctrl. Ini menunjukkan bahawa rawatan itu sedikit sebanyak memberi kesan yang positif kepada pengaktifan sel formasi tulang, iaitu osteoblas. Selain Runx2, terdapat faktor transkripsi lain yang mengawal ekspresi gen yang berkaitan dengan osteoblas yang tidak dianalisis dalam kajian ini, seperti Cbfa1. Oleh itu, terdapat kemungkinan bahawa tindakan VCO yang meningkatkan ekspresi gen osteoblas adalah juga melalui faktor transkripsi yang lain.

Berdasarkan kajian lepas, polifenol daripada tumbuhan lazimnya berupaya memelihara kesihatan tulang. Dalam kajian ini, minyak kelapa dara yang kaya dengan polifenol turut menunjukkan kesan yang sama. Pada tulang tikus yang mengalami osteoporosis, rawatan menggunakan VCO meningkatkan ekspresi gen antioksidan SOD dan GPX yang bertindak mengawal aktiviti radikal bebas yang menyumbang kepada kerapuhan tulang. Di samping itu, peningkatan ekspresi gen osteokalsin yang merupakan penanda bagi formasi tulang turut menunjukkan bahawa VCO membantu dalam membina tulang.

KESIMPULAN

Keputusan kajian ini telah menguatkan lagi pemahaman tentang mekanisme cara tindakan minyak kelapa dara dalam memelihara dan mencegah kerosakan tulang akibat osteoporosis pascamenopaus. Keupayaan minyak kelapa dara untuk mencegah dan merawat osteoporosis adalah melalui sifat antioksidannya, memandangkan pada peringkat molekular, ia meningkatkan ekspresi gen antioksidan. Di samping itu, kajian ini juga telah membuktikan satu lagi sifat minyak kelapa dara iaitu sebagai agen formasi tulang dan ia didapati telah meningkatkan proses osteoblastogenesis. Kajian selanjutnya seperti ujian klinikal perlu dijalankan memandangkan minyak kelapa dara mempunyai potensi yang besar untuk digunakan sebagai agen anti-osteoporosis.

PENGHARGAAN

Ribuan terima kasih diucapkan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) kerana menyediakan geran kajian, juga kepada pegawai-pegawai di Jabatan Farmakologi, Fakulti Perubatan UKM untuk segala bantuan teknikal. Kami turut berterima kasih kepada Biococo Marketing kerana telah bermurah hati menyediakan minyak kelapa dara untuk digunakan dalam kajian ini.

RUJUKAN

- Abujazia, M.A., Muhammad, N., Shuid, A.N. & Soelaiman, I.N. 2012. The effects of virgin coconut oil on bone oxidative status in ovariectomised rat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2012 (January): 525079.
- Aggarwal, N., Raveendran, A., Khandelwal, N., Sen, R.K., Thakur, J.S., Dhaliwal, L.K., Singla, V. & Manoharan, S.R. 2011. Prevalence and related risk factors of osteoporosis in peri- and postmenopausal Indian women. *Journal of Mid-Life Health* 2(2): 81-85.
- Almeida, M. 2010. Aging and oxidative stress: A new look at Old Bone. *IBMS BoneKEy* 7(10): 340-352.
- Arai, M., Shibata, Y., Pugdee, K., Abiko, Y. & Ogata, Y. 2007. Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 Cells. *IUBMB Life* 59(1): 27-33.
- Arunima, S. & Rajamohan, T. 2012. Virgin coconut oil improves hepatic lipid metabolism in rats—compared with copra oil, olive oil and sunflower oil. *Indian Journal of Experimental Biology* 50(11): 802-809.
- 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., Lee, K.W. & Kang, M.I. 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.
- Behfar, A.A., Sadeghi, N., Oveisi, M.R., Janat, B., Hajimahmoodi, M., Jamshidi, A.R., Behzad, M. & Rastegary, P. 2008. The plasma antioxidant activity of superoxide dismutase enzyme in osteoporosis. *Acta Medica Iranica* 46(6): 441-446.
- Bellanti, F., Matteo, M., Rollo, T., De Rosario, F., Greco, P., Vendemiale, G. & Serviddio, G. 2013. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: Impact of estrogen therapy. *Redox Biology* 1(1): 340-346.

- Bu, S.Y., Hunt, T.S. & Smith, B.J. 2009. Dried plum polyphenols attenuate the detrimental effects of TNF-alpha on osteoblast function coincident with up-regulation of Runx2, osterix and IGF-I. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20(1): 35-44.
- Cao, Y., Zhou, Z., de Crombrughe, B., Nakashima, K., Guan, H., Duan, X., Jia, S-F. & Kleinerman, E.S. 2005. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in *Murine osteosarcoma*. *Cancer Research* 65(4): 1124-1128.
- Chen, J.R., Lazarenko, O.P., Wu, X., Kang, J., Blackburn, M.L., Shankar, K., Badger, T.M. & Ronis, M.J. 2010. Dietary-induced serum phenolic acids promote bone growth via p38 MAPK/b-catenin canonical Wnt signaling. *Journal of Bone and Mineral Research* 25(11): 2399-2411.
- Datta, H.K., Ng, W.F., Walker, J.A., Tuck, S.P. & Varanasi, S.S. 2008. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* 61(5): 577-587.
- Dia, V.P., Garcia, V.V. & Mabesa, R.C. 2005. Comparative physiological characteristics of virgin coconut oil produced by different methods. *Philippine Agricultural Scientist* 88(1): 462-475.
- Duthie, G.G., Duthie, S.J. & Kyle, J.A. 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: Implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews* 13(1): 79-106.
- Eastell, R. 2013. Identification and management of osteoporosis in older adults. *Medicine* 41(1): 47-52.
- Franklin, M., Bu, S.Y., Lerner, M.R., Lancaster, E.A., Bellmer, D., Marlow, D., Lightfoot, S.A., Arjmandi, B.H., Brackett, D.J., Lucas, E.A. & Smith, B.J. 2006. Dried plum prevents bone loss in a male osteoporosis model via IGF-I and the RANK pathway. *Bone* 39(6): 1331-1342.
- Gaur, T., Lengner, C.J., Hovhannisyann, H., Bhat, R.A., Bodine, P.V., Komm, B.S., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S. & Lian, J.B. 2005. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280(39): 33132-33140.
- Hayatullina, Z., Muhammad, N., Mohamed, N. & Soelaiman, I.N. 2012. Virgin coconut oil supplementation prevents bone loss in osteoporosis rat model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2012 (January): 237236.
- Høegh-Andersen, P., Tankó, L.B., Andersen, T.L., Lundberg, C.V., Mo, J.A., Heegaard, A-M., Delaissé, J-M. & Christgau, S. 2004. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: Validation and application. *Arthritis Research & Therapy* 6(2): R169-180.
- Jagger, C.J., Lean, J.M., Davies, J.T. & Chambers, T.J. 2005. Tumor necrosis factor-alpha mediates osteopenia caused by depletion of antioxidants. *Endocrinology* 146(1): 113-118.
- Jee, W.S.S. 1995. Animal models in the prevention and treatment of osteopenia: Forward. *Proceedings of the International Conference on Animal Models in the Prevention and Treatment of Osteopenia*. Cairns, Australia, February 11-13. *Bone* 17(4): S113-114.
- Kamariah, L., Azmi, A., Rosmawati, A., Wai Ching, M.G., Azlina, M.D., Sivapragasam, A., Tan, C.P. & Lai, O.M. 2008. Physico-chemical and quality characteristics of virgin coconut oil - A Malaysian survey. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 36(2): 239-248.
- Kaveh, Kamran, Rashid Ibrahim, Mohd Zuki Abubakar & Tengku Azmi Ibrahim. 2010. Osteoporosis induction in animal model. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 5(2): 139-145.
- Lean, J.M., Davies, J.T., Fuller, K., Jagger, C.J., Kirstein, B., Partington, G.A., Urry, Z.L. & Chambers, T.J. 2003. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *The Journal of Clinical Investigation* 112(6): 915-923.
- Lelovas, P.P., Xanthos, T.T., Thoma, S.E., Lyritis, G.P. & Dontas, I.A. 2008. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Medicine* 58(5): 424-430.
- Liau, K.M., Lee, Y.Y., Chen, C.K. & Rasool, A.H. 2011. An open-label pilot study to assess the efficacy and safety of virgin coconut oil in reducing visceral adiposity. *ISRN Pharmacology* 2011(January): 1-7.
- Lim, P.S., Ong, F.B., Adeeb, N., Seri, S.S., Noor-Aini, M.Y., Shamsuddin, K., Hapizah, N., Mohamed, A.L., Mokhtar, A. & Wan, H.W.H. 2005. Bone health in urban midlife Malaysian women: Risk factors and prevention. *Osteoporosis International* 16(12): 2069-2079.
- 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.
- Manolagas, S.C. 2010. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine Reviews* 31(2010): 266-300.
- Mansor, T.S.T., Che Man, Y.B., Shuhaimi, M., Abdul Afiq, M.J. & Ku Nurul, F.K.M. 2012. Physicochemical properties of virgin coconut oil extracted from different processing methods. *International Food Research Journal* 19(3): 837-845.
- Marina, A.M., Che Man, Y.B., Nazimah, S.A.H. & Amin, I. 2009. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60(S2): 114-123.
- Miller, S.C., Bowman, B.M. & Jee, W.S.S. 1995. Available animal models of osteopenia - Small and large. *Bone* 17(4): S117-123.
- Muthusami, S., Ramachandran, I., Muthusamy, B., Vasudevan, G., Prabhu, V., Subramaniam, V., Jagadeesan, A. & Narasimhan, S. 2005. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clinica Chimica Acta* 360(1-2): 81-86.
- Naylor, K. & Eastell, R. 2012. Bone turnover markers: Use in osteoporosis. *Nature Reviews Rheumatology* 8(7): 379-389.
- Nevin, K.G. & Rajamohan, T. 2010. Effect of topical application of virgin coconut oil on skin components and antioxidant status during dermal wound healing in young rats. *Skin Pharmacology and Physiology* 23(6): 290-297.
- 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. *E-SPEN, the European E-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 3(1): e1-e8.
- Nevin, K.G. & Rajamohan, T. 2006. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. *Food Chemistry* 99(2): 260-266.
- Novack, D.V. & Faccio, R. 2011. Osteoclast motility: Putting the brakes on bone resorption. *Ageing Research Reviews* 10(1): 54-61.
- Oveisi, M.R., Sadeghi, N., Jannat, B., Hajimahmoodi, M., Hdjibabaie, M. & Behfar, A. 2011. Evaluation of antioxidants in bone mineral density of Iranian osteoporotic women. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 14(2): 158-166.
- Puel, C., Quintin, A., Agalias, A., Mathey, J., Obled, C., Mazur, A., Davicco, M.J., Lebecque, P., Skaltsounis, A.L. & Coxam,

- V. 2004. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomized rat. *The British Journal of Nutrition* 92(1): 119-127.
- Raisz, L.G. 2005. Science in medicine pathogenesis of osteoporosis : Concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigation* 115(12): 3318-3325.
- Rao, L.G., Kang, N. & Rao, A.V. 2012. Review. In *SpringerReference*, edited by Dr Venketeshwer Rao, InTech. Springer. pp. 467-486.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M. & Nihal, A. 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal* 22(3): 659-661.
- Rendina, E., Hembree, K.D., Davis, M.R., Marlow, D., Clarke, S.L., Halloran, B.P., Lucas, E.A. & Smith, B.J. 2013. Dried plum's unique capacity to reverse bone loss and alter bone metabolism in postmenopausal osteoporosis model. *PLoS One* 8(3): e60569.
- Riggs, B.L., Khosla, S. & Melton, L.J. 2002. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine Reviews* 23(3): 279-302.
- Sánchez-Rodríguez, M.A., Ruiz-Ramos, M., Correa-Muñoz, E. & Mendoza-Núñez, V.M. 2007. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskeletal Disorders* 8: 124.
- Sen, S., Raja Chakraborty, Sridhar, C., Reddy, Y.S.R. & Biplab De. 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect nitrogen species. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3(1): 91-100.
- Shen, C-L., Yeh, J.K., Cao, J.J., Chyu, M-C. & Wang, J-S. 2011. Green tea and bone health: Evidence from laboratory studies. *Pharmacological Research* 64(2): 155-161.
- Shen, C-L., Wang, P., Guerrieri, J., Yeh, J.K. & Wang, J-S. 2008. Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats. *Osteoporosis International* 19(7): 979-990.
- Weatherholt, A.M., Fuchs, R.K. & Warden, S.J. 2012. Specialized connective tissue: Bone, the structural framework of the upper extremity. *Journal of Hand Therapy* 25(2): 123-131.
- Wu, W-T., Lee, R-P., Wang, C-H., Fang, T-C., Lin, N-T., Chen, I-H. & Hsu, B-G. 2010. The association of serum osteoprotegerin and osteoporosis in postmenopausal hemodialysis patients: A pilot study. *Journal of Women's Health* 19(4): 785-790.
- Xiao, G., Wang, D., Benson, M.D., Karsenty, G. & Franceschi, R.T. 1998. Role of the α 2-Integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry* 273(49): 32988-32994.
- Yarrow, J.F., Conover, C.F., Purandare, A.V., Bhakta, A.M., Zheng, N., Conrad, B., Altman, M.K., Franz, S.E., Wronski, T.J. & Borst, S.E. 2008. Supraphysiological testosterone enanthate administration prevents bone loss and augments bone strength in gonadectomized male and female rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295(5): E1213-E1222.
- Yoon, K-H., Cho, D-C., Yu, S-H., Kim, K-T., Jeon, Y. & Sung, J-K. 2012. The change of bone metabolism in ovariectomized rats : Analyses of microCT scan and biochemical markers of bone turnover. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 51(6): 323-327.
- Zhang, C., Tang, W., Li, Y., Yang, F., Dowd, D.R. & MacDonald, P.N. 2011. Osteoblast-specific transcription factor osterix increases vitamin D receptor gene expression in osteoblasts. *PLoS One* 6(10): e26504.

Shidqiyyah Abdul-Hamid, Norliza Muhammad* & Isa Naina Mohamed
 Jabatan Farmakologi, Fakulti Perubatan
 Bangunan Pra-Klinikal PPUKM
 Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latiff
 56000 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan
 Malaysia

Shidqiyyah Abdul-Hamid
 Department of Basic Medical Sciences for Nursing
 Kulliyah of Nursing, Universiti Islam Antarabangsa Malaysia
 53100 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan
 Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: norliza_ssp@yahoo.com

Diserahkan: 16 September 2015

Diterima: 29 April 2016