

AKTIVITAS KEMOPREVENSI EKSTRAK TEMU MANGGA

Aryo Tedjo¹, Dondin Sajuthi², Latifah K. Darusman³

1. Departemen Kimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia
2. Pusat Studi Satwa Primata, Lembaga Penelitian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia
3. Pusat Studi Biofarmaka, Lembaga Penelitian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

E-mail: kimfkui@yahoo.com

Abstrak

Aktivitas kemoprevensi ekstrak temu mangga ditentukan berdasarkan pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode bilangan peroksida dan aktivitas glutathione-S-transferase (GST) pada medium kultur dan sel lisat (aktivitas GST total) sel Chang. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, yang disebabkan oleh senyawa fenolik. Pemberian fraksi 4 dan fraksi 7 pada medium kultur sel Chang menunjukkan peningkatan aktivitas GST. Aktivitas GST total (GST sitosol dan GST mikrosomal) mengalami peningkatan ketika H₂O₂ dan Fe⁺² diberikan ke dalam medium sel Chang. Penurunan aktivitas GST total terjadi ketika pada medium sel Chang diberikan tambahan fraksi 4 dan fraksi 7 ekstrak etanol dibandingkan dengan yang hanya diberikan H₂O₂ dan Fe⁺².

Abstract

Chemoprevention Activity of Temu Mangga Extracts. The chemoprevention activity of temu mangga extracts was investigated by determination of antioxidant activity with a peroxidation number method and glutathione-S-transferase (GST) activity in Chang medium culture and cell lysate (total GST activity). The results indicated that ethanol extract has a strong antioxidant activity. It is caused by the phenolic group in the ethanol extract. Treatment Chang cell culture with 7th and 4th ethanol fractions increased the GST activity when compared to the control. The total GST activity (cytosolic and microsomal) increased when Chang cell culture was treated with H₂O₂/Fe⁺². The decrease of the total GST activity was observed when 7th and 4th ethanol fractions were supplemented with H₂O₂/Fe⁺² compared to the cell culture receiving H₂O₂/Fe⁺² only.

Keywords: antioxidant activity, Curcuma mangga, glutathione-S-transferase, Chang cell culture

1. Pendahuluan

Dewasa ini penelitian senyawa-senyawa yang berfungsi sebagai kemoprevensi, terutama senyawa yang berperan dalam pencegahan kanker, semakin berkembang. Senyawa kemoprevensi adalah senyawa yang dapat mencegah/memblok proses karsinogenesis dari tahap yang paling sedini mungkin¹. Mekanisme senyawa kemoprevensi dalam pencegahan kanker diantaranya adalah : berperan dalam menghambat pembelahan sel kanker, mencegah interaksi antara senyawa karsinogenik dengan molekul DNA, dan menginduksi kerja enzim yang berperan dalam detoksifikasi senyawa karsinogenik di dalam tubuh².

Penelitian mengenai senyawa kemoprevensi sendiri dimulai pada tahun 1973 ketika Watterberg menemukan fakta bahwa butil hidroksi anisol (BHA), suatu senyawa aditif yang bersifat antioksidan, mampu melindungi rodensia yang dijadikan obyek penelitiannya terhadap senyawa-senyawa karsinogenik. Dalam penelitian berikutnya pada tahun 1978,

diketahui bahwa BHA mampu menginduksi aktivitas glutathion-S-transferase (GST), yaitu suatu enzim yang berperan dalam proses detoksifikasi senyawa-senyawa asing di dalam tubuh³. Sejak diketahui ada hubungan antara sifat antioksidan suatu senyawa dengan aktivitas GST, pencarian senyawa antioksidan baru, terutama yang berasal dari bahan alam, juga diarahkan kepada mekanisme kemoprevensinya.

Salah satu tumbuhan yang telah diketahui memiliki sifat antioksidan adalah yang berasal dari anggota famili *Zingiberaceae*, yang di Indonesia dikenal dengan kunyit atau temu-temuan. Beberapa spesies dari tumbuhan ini diketahui memiliki kandungan senyawa yang bersifat antioksidan seperti kurkumin yang terdapat pada kunyit (*Curcuma longa*) serta gingerol yang terdapat pada jahe (*Zingiber officinale*) dan temu putih (*Curcuma zedoaria*).

Temu mangga (*Curcuma mangga*) merupakan salah satu jenis temu yang tumbuh di Indonesia. Selain di Indonesia, temu mangga juga dijumpai di daerah sekitar ekuatorial lainnya seperti Malaysia (dikenal dengan sebutan temu pauh) dan Thailand (kha min khao). Ciri khas tanaman ini adalah umbinya (yang berwarna kuning dan berbintik seperti jahe) memiliki bau khas seperti bau mangga. Beberapa manfaat temu mangga sebagai obat tradisional diantaranya adalah sebagai obat mag, diare, penghilang nyeri saat haid, keputihan, serta mengobati jerawat dan bisul. Tidak seperti seperti *C. longa* dan *C. zedoaria* yang telah banyak diteliti, kandungan kimia dan bioaktivitas temu mangga belum banyak diketahui.

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan ekstrak temu mangga dengan aktivitas antioksidan tertinggi, dan untuk mengetahui aktivitas kemoprevensi temu mangga, dilihat dari pengaruhnya terhadap aktivitas glutathion-S-transferase pada sel Chang (ATCC CCL 13).

2. Metode Penelitian

Rimpang temu mangga masing-masing sebanyak 100 g dikeringkan dan dihaluskan, kemudian dilakukan maserasi dengan pelarut etanol, kloroform, heksana dan air selama 1 hari untuk mendapatkan ekstraknya. Selanjutnya, masing-masing ekstrak diuji aktivitas antioksidan, menggunakan metode bilangan peroksidasi (metode Lea)⁴.

Ekstrak dengan aktivitas antioksidan tertinggi difraksinasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fasa diam silika gel. Beberapa fraksi kemudian diuji kembali aktivitas antioksidannya untuk mendapatkan fraksi dengan aktivitas antioksidan tertinggi.

Uji aktivitas kemoprevensi dilakukan dengan melihat pengaruh pemberian fraksi aktif (fraksi dengan aktivitas antioksidan tertinggi) terhadap aktivitas GST. Pengukuran aktivitas GST dilakukan pada medium kultur dan sitosol sel Chang (ATCC CCL 13) menggunakan metode Habig⁵.

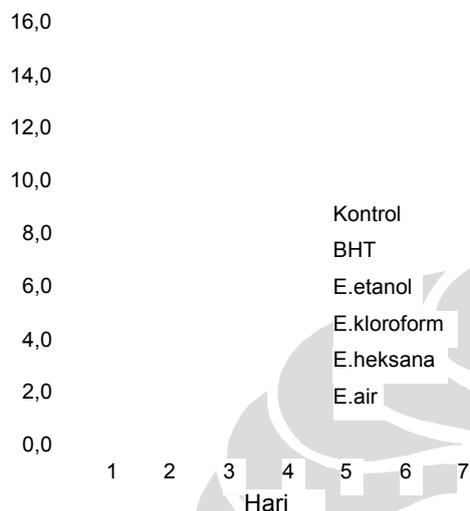
Medium kultur (yang telah dipisahkan dari selnya) diberi fraksi aktif sebanyak 50 ppm. Campuran tersebut diinkubasi selama 1 hari pada suhu 37 °C kemudian, dilakukan pengukuran aktivitas GST. Efek induksi dilihat dari peningkatan aktivitas GST akibat pemberian fraksi aktif terhadap kontrol.

Untuk melihat respon seluler pengaruh pemberian fraksi aktif terhadap aktivitas GST, dilakukan juga pengukuran aktivitas GST sel Chang. Aktivitas GST diukur setiap hari pada medium kultur dimulai sehari setelah pemberian fraksi sampai hari sel akan difasase (3 hari).

Pengaruh pemberian fraksi aktif dalam menekan stres oksidatif (efek supresi) dilakukan dengan mengukur aktivitas GST pada sitosol sel Chang. Perlakuan terhadap sel Chang adalah kontrol, inisiator radikal (insrad) berupa Fe^{+2}/H_2O_2 , dan insrad + fraksi aktif. Perlakuan diberikan setelah sel berumur 2 hari. Pada hari ke-6 sel dilisiskan. Sel dikumpulkan dan disentrifugasi pada 1000-2000 x g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Setelah itu, sel dihomogenisasi dalam 3 ml dapar dingin (100 mM kalium fosfat pH 7.0) dan disentrifugasi kembali pada 10.000 x g selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil dan diukur aktivitas GST-nya. Supernatan dibekukan pada -70 °C bila pengukuran aktivitas GST tidak dilakukan pada hari yang sama.

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak temu mangga dengan metode Lea dapat dilihat pada Gambar 1. Konsentrasi masing-masing ekstrak dan BHT yang diberikan adalah sebesar 0,05 % dengan 3 kali ulangan. Konsentrasi ini sesuai dengan yang disyaratkan oleh *Food and Drug Administration* yaitu sekitar 0.01 - 0,1 %⁴. Pada Gambar 1 terlihat bahwa semua ekstrak temu mangga mampu menekan terbentuknya peroksida selama proses oksidasi lipid. Berdasarkan analisis sidik ragam, mulai hari ke-4 dan seterusnya, semua ekstrak



Gambar 1. Aktivitas antioksidan ekstrak temu mangga dengan metode Lea (n=3) E = ekstrak

secara nyata ($P < 0,05$) mampu menurunkan bilangan peroksida. Hal ini menandakan terdapat aktivitas antioksidan pada semua ekstrak. Nilai bilangan peroksida dari masing-masing ekstrak pada hari ke-7 dapat dilihat pada Tabel 1. Dari Gambar 1 dan Tabel 1 dapat diketahui bahwa urutan aktivitas antioksidan adalah: BHT > ekstrak etanol > ekstrak kloroform > ekstrak heksana \approx ekstrak air.

Uji aktivitas antioksidan lebih lanjut hanya dilakukan pada beberapa fraksi etanol. Sebagian fraksi telah diidentifikasi sebagai kurkuminoid, merujuk pada hasil KLT (dengan fasa diam silika gel 60GF254 dan fasa gerak etanol : kloroform : heksana = 1 : 9 : 1) antara standar kurkuminoid dengan fraksi etanol temu mangga, serta metode identifikasi kurkuminoid yang dilakukan oleh Leon dan kawan-kawan⁶. Fraksi yang teridentifikasi adalah

fraksi 7 (f7), fraksi 6 (f6), dan fraksi (f5) yang berturut-turut adalah senyawa kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetok-sikurkumin. Fraksi lain seperti fraksi 4 (f4) dan fraksi 5 (f5) diketahui tergolong senyawa fenolik setelah diuji dengan larutan FeCl_3 1% dan dianalisis secara spektroskopi.

Tabel 1. Bilangan peroksida ekstrak hari ke-7

Jenis Ekstrak	Bilangan Peroksida*
Kontrol (n=3)	15,00 + 0,20 ^a
Ekstrak Heksana (n=3)	13,40 + 0,10 ^b
Ekstrak Air (n=3)	13,33 + 0,10 ^b
Ekstrak Kloroform (n=3)	13,00 + 0,17 ^c
Ekstrak Etanol (n=3)	12,40 + 0,10 ^d
BHT (n=3)	11,90 + 0,15 ^e

* Nilai rerata yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5 %

25,

20,

15,

10,

5,

1

2

3

4

5

7

Hari

mampu

menangkap

lipid.

Aktivitas

kemoprevensi

temu

mangga

diarahkan

terutama

pada

mekanisme

induksi

aktivitas

glutation-S-transferase

(GST)

dan

menekan

stres

oksidatif.

Induksi

aktivitas

GST

dilakukan

pada

medium

sel

Chang

(ATCC

CCL 13)

yang

berumur

6

hari

dan

saat

akan

difasase.

Medium

yang

telah

dipisahkan

dari

selnya

diberikan

fraksi

4 (f4)

dan

fraksi

7 (f7)

masing-masing

sebanyak

50

ppm.

Pemilihan

konsentrasi

ekstrak

dilakukan

berdasarkan

pertimbangan

konsentrasi

yang

diuji

tidak

menyebabkan

kematian

sel

sampai

sel

akan

difasase.

Fraksi

4 (f4)

dipilih

karena

memiliki

aktivitas

antioksidan

tertinggi

dan

fraksi

7 (f7)

dipakai

sebagai

pembanding

karena

dari

penelitian

yang

dilakukan

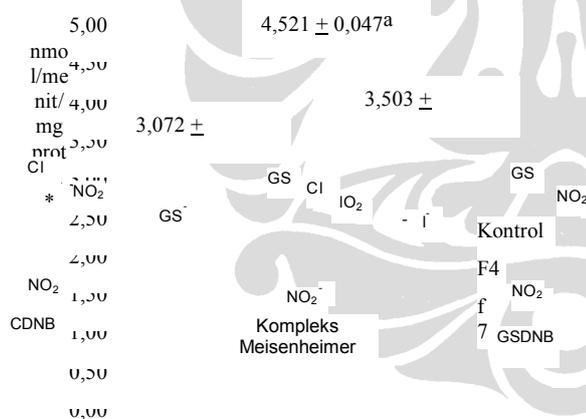
oleh

Gambar 2. Aktivitas antioksidan fraksi etanol temu mangga dengan metode Lea (konsentrasi masing-masing fraksi adalah 0,05 % dengan n=3)

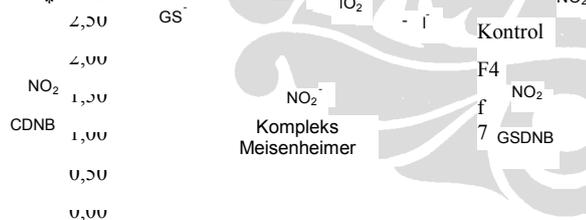
Hasil uji aktivitas antioksidan beberapa fraksi etanol dapat dilihat pada Gambar 2. Pada Gambar 2 terlihat bahwa fraksi 4 memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan fraksi lain. Sedangkan bila dibandingkan dengan BHT, lipid yang diberi fraksi 4 memiliki bilangan peroksida yang lebih kecil kecuali untuk hari ke-5. Hal ini berarti sifat antioksidan fraksi 4 lebih baik dibandingkan BHT. Urutan aktivitas antioksidan fraksi etanol *C. mangga* adalah : f4 > BHT > f7 > f8 > f6.

Hasil uji aktivitas antioksidan juga menunjukkan bahwa f7 (kurkumin) memiliki kemampuan untuk menekan pembentukan peroksida lebih baik dibandingkan BHT pada awal inkubasi (hari pertama dan kedua). Dari penelitian aktivitas antioksidan sebelumnya diketahui bahwa senyawa kurkumin dan turunannya mampu menghambat proses oksidasi hemoglobin oleh senyawa nitrit⁷. Pada penelitian yang sama juga diketahui bahwa senyawa kurkumin mampu menangkap radikal hidroksil dan anion superoksida yang merupakan inisiator terjadinya peroksidasi lipid.

Aktivitas kemoprevensi temu mangga diarahkan terutama pada mekanisme induksi aktivitas glutathion-S-transferase (GST) dan menekan stres oksidatif. Induksi aktivitas GST dilakukan pada medium sel Chang (ATCC CCL 13) yang berumur 6 hari dan saat akan difasase. Medium yang telah dipisahkan dari selnya diberikan fraksi 4 (f4) dan fraksi 7 (f7) masing-masing sebanyak 50 ppm. Pemilihan konsentrasi ekstrak dilakukan berdasarkan pertimbangan konsentrasi yang diuji tidak menyebabkan kematian sel sampai sel akan difasase. Fraksi 4 (f4) dipilih karena memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dan fraksi 7 (f7) dipakai sebagai pembanding karena dari penelitian yang dilakukan oleh



Gambar 3. Pengaruh pemberian fraksi etanol temu mangga (f4 dan f7) terhadap aktivitas GST spesifik diukur pada 26,0 °C *nilai rerata (n=3) yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5 %.



Gambar 4. Reaksi Substitusi Nukleofilik antara GS⁻ dan CDNB

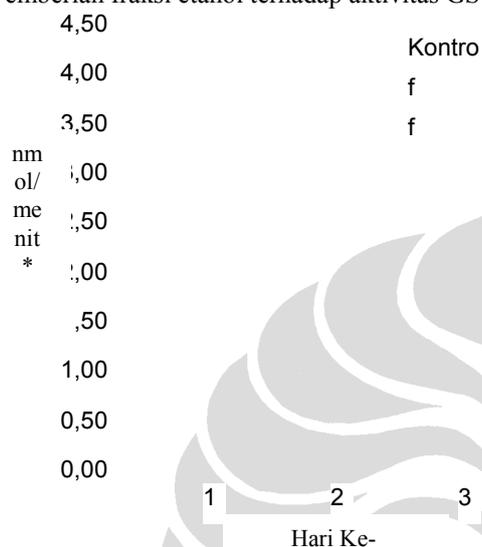
Piper dan kawan-kawan⁸, senyawa kurkumin diketahui mampu menginduksi aktivitas GST homogenat sel hati dari tikus yang diberi diet senyawa tersebut. Pengukuran aktivitas GST dilakukan setelah medium berisi enzim diinkubasi dengan f4 dan f7 selama satu hari pada suhu 37 °C.

Hasil pengukuran aktivitas GST spesifik menunjukkan bahwa bahwa f4 mampu menginduksi aktivitas GST lebih baik dibandingkan f7, yang merupakan senyawa kurkumin (Gambar 3). Hal ini dapat dilihat dari aktivitas GST yang lebih tinggi pada medium berisi enzim GST yang diinkubasi dengan f4 dibandingkan dengan medium yang diinkubasi dengan f7. Apabila dibandingkan dengan kontrol (medium tanpa diinkubasi dengan fraksi etanol temu mangga), fraksi 4 dan f7 memiliki kemampuan dalam meningkatkan aktivitas GST masing-masing sebesar 47 % dan 15 %.

Dalam mekanisme kerjanya, GST mengkatalisis reaksi substitusi nukleofilik oleh glutathion (GS⁻) dengan suatu molekul elektrofilik seperti 1-kloro-2,4-dinitrobenzena atau CDNB (Gambar 4). Dalam reaksi tersebut terbentuk keadaan transisi yang melibatkan 2 partikel (GS⁻ dan CDNB). Berdasarkan mekanisme reaksi substitusinya, reaksi yang melibatkan keadaan transisi seperti ini digolongkan ke dalam reaksi SN₂ atau bersifat bimolekuler⁹. Hal ini berarti bahwa aktivitas GST akan dipengaruhi oleh konsentrasi kedua molekul tersebut (GS⁻ dan CDNB).

Selain bekerja mengkonjugasikan molekul elektrofilik dengan bantuan GST, glutation juga dapat berperan sebagai agen pereduksi dan penangkap radikal bebas³. Kemampuan senyawa penangkap radikal bebas atau bersifat antioksidan (dalam hal ini senyawa fenolik) dalam menginduksi aktivitas GST tampaknya disebabkan kemampuan senyawa ini dalam mencegah terjadinya proses oksidasi glutation atau mereduksi kembali glutation teroksidasi (GSSG) menjadi bentuk yang tereduksi (GSH). Salah satu mekanisme yang telah diketahui dari proses oksidasi-reduksi glutation adalah melalui mekanisme tiohemiketal¹⁰.

Pemberian fraksi etanol terhadap aktivitas GST ekstraseluler sel Chang dapat dilihat pada Gambar 5.



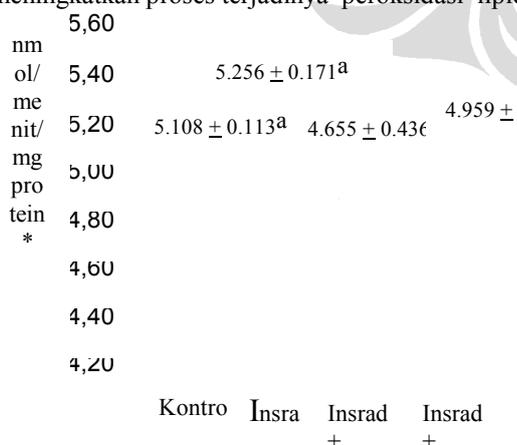
Gambar 5. Aktivitas GST pada medium sel Chang yang diberi fraksi etanol temu mangga (f4 dan f7) diukur pada 26,0 °C dengan konsentrasi 50 ppm (n=3)

Hasil pengukuran aktivitas GST juga menunjukkan bahwa kultur sel Chang yang mediumnya diberi f4 dan f7 cenderung memiliki aktivitas GST yang lebih tinggi dibanding kontrol walaupun tidak berbeda nyata. Penelitian sebelumnya dengan menggunakan metode *Westren Blot* menunjukkan bahwa senyawa-senyawa fenolik seperti CDNB dan 4-klorofenol mampu menginduksi ekspresi gen GST intraseluler bakteri *Ochrobactrum anthropi*¹¹. Hasil penelitian ini selain menunjukkan senyawa antioksidan mampu meningkatkan aktivitas GST, juga menunjukkan aktivitas GST ekstraseluler atau aktivitas GST plasma dapat dijadikan sebagai biomarker untuk melihat respon pemberian suatu senyawa terhadap aktivitas detoksifikasi.

Pengaruh pemberian fraksi etanol temu mangga dalam menekan stres oksidatif (efek supresi) dilakukan dengan mengukur aktivitas GST total (sitosol dan mikrosomal) dari sel Chang yang telah dilisiskan. Hasil pengukuran aktivitas GST total dapat dilihat pada Gambar 6.

Pada Gambar 6 terlihat bahwa aktivitas GST total cenderung semakin meningkat akibat pemberian insrad (H_2O_2 dan Fe^{+2}) walaupun tidak berbeda nyata terhadap kontrol. Hal ini menunjukkan telah terjadi peningkatan aktivitas sel dalam proses detoksifikasi, khususnya yang dilakukan oleh GST.

Selama ini telah diketahui bahwa H_2O_2 bertanggungjawab dalam proses kerusakan DNA¹², protein¹³, dan membran sel atau yang dikenal dengan peroksidasi lipid¹⁴. Sedangkan ion Fe^{+2} berperan dalam tahap inisiasi radikal bebas dan meningkatkan proses terjadinya peroksidasi lipid. Hal ini terjadi karena ion



Gambar 6. Aktivitas GST total (sitosol dan mikrosomal) yang diukur pada 26,0 °C]

***Nilai rerata (n=3) yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5 %.**

Fe^{+2} berperan dalam mereduksi H_2O_2 menjadi radikal $\cdot OH$ yang bersifat lebih reaktif dibandingkan dengan H_2O_2 . Reaksi yang terjadi dikenal sebagai reaksi Fenton¹⁵.

Pada Gambar 6 juga terlihat bahwa aktivitas GST total yang lebih rendah dialami pada perlakuan insrad dengan penambahan fraksi etanol temu mangga (f4 dan f7) dibandingkan dengan tanpa penambahan fraksi etanol temu mangga. Hal ini berarti f4 dan f7 berpotensi dalam menekan terjadinya stres oksidatif sekaligus berpotensi dalam melindungi sel hati dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Pada penelitian sebelumnya pada tikus yang diberi dietilnitrosamina (DEN), suatu senyawa karsinogenik, penurunan aktivitas

GST sitosol homogenat sel hati terjadi pada tikus yang diberi diet jangka panjang dengan tokotrienol selama 9 bulan¹⁶. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan waktu pengamatan yang lebih singkat, efek supresi terhadap stres oksidatif dari senyawa tertentu dapat diuji terlebih dahulu pada sel Chang (sebagai studi awal) sebelum dilakukan uji pada hewan percobaan.

4. Kesimpulan

Beberapa senyawa fenolik pada ekstrak etanol temu mangga memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan BHT. Selain memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi, senyawa fenolik dalam temu mangga yaitu yang terdapat pada fraksi 4 (f4) dan fraksi 7 (f7) ekstrak etanol, mampu menginduksi aktivitas glutathione-S-transferase (GST) masing-masing sebesar 47 % dan 15 % dibandingkan dengan kontrol.

Pada penelitian ini juga didapatkan hasil bahwa f4 dan f7 mampu menekan terjadinya stres oksidatif yang dapat diamati dari penurunan aktivitas GST total pada sel Chang yang diberi Fe^{+2} dan H_2O_2 sebagai inisiator radikal bebas

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Studi Biofarmaka dan Pusat Studi Satwa Primata, Lembaga Penelitian, Institut Pertanian Bogor, untuk dana dan fasilitas yang diberikan pada penelitian ini.

Daftar Acuan

1. Watterberg LW. Inhibition of Carcinogenesis by Minor Dietary Constituents. *Cancer Res* 1992; 52: 2085-2087.
2. McLellan LI, Judah DJ, Neal GE, Hayes JD. Regulation of Aflatoxin B1-metabolizing Aldehyde Reductase and Glutathione S-transferase by Chemoprotectors. *Biochem J* 1994; 300: 117-224.
3. Ahmad H, Tijerina MT, Tobola AS. Preferential Overexpression of a Class MU Glutathione S-Transferase Subunit in Mouse Liver by Myristicin. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 236: 825-828.
4. Cott G. *Bull Chem Soc Japan* 1988; 61: 165-170.
5. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
6. Araújo CAC, Leon LL. Biological Activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 723-728.
7. Unnikrishnan MK, Rao MN. Inhibition of Nitrite Induced Oxidation Of Hemoglobin By Curcuminoids. *Pharmazie* 1995; 50: 490-492.
8. Piper JT, Singhal SS, Salameh MS, Torman RT, Awasthi YC, Awasthi S. Mechanisms of Anticarcinogenic Properties of Curcumin: The Effect of Curcumin on Glutathione Linked Detoxification Enzymes In Rat Liver. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 445-456.
9. Fessenden RJ, Fessenden JS. *Organic Chemistry*. California: Wadsworth Inc, 1990.
10. Awasthi S, Srivastava SK, Ahmad F, Ahmad H, Ansari GAS. Interactions of Glutathione S-transferase p with Ethacrynic Acid and Its Glutathione Conjugate. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1164: 173-178.
11. Favoloro B, Tamburro A, Trofino MA, Bologna L, Rotilio D, Heipieper HJ. Modulation of the Glutathione S-Transferase in *Ochrobactrum anthropi*: Function of Xenobiotic Substrates and Other Forms of Stress. *Biochem J* 2000; 346: 553-559.
12. Hoffman ME, Mello-Filho AC, Meneghini R. Correlation between Cytotoxic Effect of Hydrogen Peroxide and The Yield of DNA Strand Breaks In Cells of Different Species. *Biochim Biophys Acta* 1984; 781: 234-238.
13. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls. The cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric Oxide. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244-4250.
14. Kellogg EW, Fridovich I. Superoxide, Hydrogen Peroxide and Singlet Oxygen in Lipid Peroxidation by A Xanthine Oxidase System. *J Biol Chem* 1975; 250: 8812-8817.
15. Schafer FQ, Qian SY, Buettner GR. Iron and Free Radical Oxidations in Cell Membranes. *Cellular and Molecular Biology* 2000; 46: 657-662.
16. Rahmat A, Wan Ngah WZ, Gapor A, Khalid BAK. Long-term Tocotrienol Supplementation And Glutathione-Dependent Enzymes During Hepatocarcinogenesis in The Rat. *Asia Pacific J Clin Nutr* 1993; 2: 129-134.