

**Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in  
fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy**

**THE EFFECT OF METHYL BENZOATE AND OTHER FRACTIONS  
FROM *Acanthaster planci* IN REDUCING HYPERCHOLESTEROLEMIA**

**LUQMAN ABU BAKAR**

**2019**

**Main supervisor : Associate Professor Noraznawati Ismail, PhD.**

**Co-supervisor : Professor Tengku Sifzizul Tengku Muhammad, PhD.**

**: Vigneswari Sevakumaran, PhD.**

**Institute : Institute of Marine Biotechnology**

Hypercholesterolemia is a condition where the cholesterol level exceeded certain permitted value. Untreated hypercholesterolemia can lead to another problem which are atherosclerosis. It is the hardening of the arterial wall due to impacted free cholesterol. Marine natural products have been proven to give compound with therapeutic agent against certain diseases. This study was carried out to determine the ability of fraction 1 and methyl benzoate isolated from *Acanthaster planci*, a marine echinoderm, as a new drug candidate in reducing hypercholesterolemia via reverse cholesterol transport. Scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) is a surface protein that received cholesterol from high-density lipoprotein (HDL) and later further

metabolised in the liver. Both fraction 1 and methyl benzoate showed a non-toxic effect towards liver hepatocellular carcinoma (HepG2) cells in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay where in the series of different concentration from 6.25 to 100  $\mu\text{g/ml}$  for fraction 1 and 1.56 to 200  $\mu\text{M}$  for methyl benzoate, all concentrations proliferated the cells growth. Fraction 1 and methyl benzoate was also tested its ability in increasing SR-B1 promoter activity via luciferase assay. The concentration tested were from 1.56 to 50  $\mu\text{g/ml}$  of fraction 1 and 1.56 to 50  $\mu\text{M}$  of methyl benzoate. At all concentrations tested, fraction 1 increased the highest luciferase activity at 1.56  $\mu\text{g/ml}$  with 2.3-fold higher while for methyl benzoate it increased the highest promoter activity at 1.56  $\mu\text{M}$  with 1.23-fold higher than the negative control. The ability of fraction 1 and methyl benzoate to increase the expression of SR-B1 gene was determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) where at 6.25  $\mu\text{g/ml}$  of fraction 1, the gene expression was almost 2-fold higher than the negative control while 6.25  $\mu\text{M}$  methyl benzoate, the expression was at the highest with 1.24-fold higher than control. Subsequently both concentrations from fraction 1 and methyl benzoate were used to determine the HDL uptake where the results showed that the HDL uptake of fraction 1 was higher than methyl benzoate with 20%. The presence of SR-B1 protein was determined by using confocal microscope and the protein was tagged with specific SR-B1 antibody. This qualitative method showed an increase of green fluorescence at the surface of HepG2 cells after treatment with fraction 1 and methyl benzoate indicating that it increases the SR-B1 on the surface. Only methyl benzoate was used for *in-vivo* model due to the recovery of fraction 1 was very little. Methyl benzoate was administered to hypercholesterolemic Sprague-Dawley rats for 28 days via oral gavage. Blood was withdrawn after 28 days showed the rats improved lipid profile

where the HDL was increased and decreased in low-density lipoprotein (LDL) and triglyceride. Serum aminotransferases were determined, and it showed a decrease value as compared to control. From the histology analysis of the liver, evidence of cholesterol can be seen within the cells. The cholesterol droplet from the hepatocytes were semi-quantified using a simple scoring system and it showed a higher occurrence after the treatment as compared to untreated group. The findings indicate that methyl benzoate showed positive results in both *in-vitro* and *in-vivo* study in reducing hypercholesterolemia.

**Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia  
Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk ijazah Doktor Falsafah**

**KESAN EKSTRAK METIL BENZOAT DAN FRAKSI-FRAKSI LAIN DARI  
*Acanthaster planci* DALAM MENGURANGKAN  
HIPERKOLESTEROLEMIA**

**LUQMAN ABU BAKAR**

**2019**

**Penyelia Utama : Profesor Madya Noraznawati Ismail, PhD.**

**Penyelia Bersama : Profesor Tengku Sifzizul Tengku Muhammad, PhD.**

**: Vigneswari Sevakumaran, PhD.**

**Institut : Institut Bioteknologi Marin**

Hiperkolesterolemia adalah satu keadaan di mana paras kolesterol melebihi nilai yang dibenarkan. Hiperkolesterolemia yang tidak terkawal akan menyebabkan masalah lain iaitu aterosklerosis. Ia adalah penebalan dinding arteri akibat kolesterol yang terkumpul. Produk semula jadi marin telah terbukti dapat memberi sebatian yang mempunyai kesan terhadap penyakit tertentu. Kajian ini dijalankan untuk menentukan keupayaan fraksi 1 dan metil benzoat dari *Acanthaster planci*, sejenis ekinoderma marin, sebagai rawatan baru untuk merawat hiperkolesterol melalui pengangkutan kolesterol berbalik. Reseptor pemakan kelas B jenis 1 (SR-B1) adalah protein permukaan yang menerima kolesterol dari lipoprotein berketumpatan tinggi (HDL) dan kemudiannya dimetabolisma di hati. Kedua dua fraksi 1 dan metil benzoat

menunjukkan kesan tidak toksik ke atas sel karsinoma hati (HepG2) dalam asai 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) di mana pada kepekatan yang berlainan daripada 6.25 hingga 100 µg/ml fraksi 1 dan 1.56 hingga 200 µM metil benzoat, ia menunjukkan pertumbuhan sel. Kemudian fraksi 1 dan metil benzoat diuji keupayaannya dalam meningkatkan aktiviti penggalak SR-B1 melalui asai luciferase. Kepekatan yang diuji adalah dari 1.56 hingga 50 µg/ml fraksi 1 dan 1.56 hingga 50 µM metil benzoat. Pada semua kepekatan, fraksi 1 meningkatkan aktiviti penggalak dengan peningkatan tertinggi pada kepekatan 1.56 µg/ml dengan 2.3 kali lebih tinggi manakala metil benzoat meningkatkan aktiviti penggalak pada 1.56 µM dengan meningkatkan aktiviti tertinggi dengan 1.23 kali lebih tinggi daripada kawalan negatif. Keupayaan fraksi 1 dan metil benzoat untuk meningkatkan ekspresi gen SR-B1 ditentukan oleh reaksi berantai polimerase masa nyata (RT-PCR) di mana pada 6.25 µg/ml fraksi 1, ekspresi gen berada pada hampir 2 kali ganda berbanding kawalan negatif manakala 6.25 µM metil benzoat, ekspresi gen berada pada tahap tertinggi dengan 1.24 kali lebih tinggi daripada kawalan. Seterusnya kedua-dua kepekatan digunakan untuk menentukan pengambilan HDL di mana keputusan menunjukkan pengambilan HDL selepas rawatan oleh fraksi 1 adalah lebih tinggi berbanding metil benzoate dengan 20%. Kehadiran protein SR-B1 dilihat dengan menggunakan mikroskop konfokal dan protein ditandakan dengan antibodi spesifik untuk SR-B1. Kaedah kualitatif ini menunjukkan peningkatan cahaya hijau di permukaan sel HepG2 selepas rawatan dengan fraksi 1 dan metil benzoat menunjukkan bahawa ia meningkatkan SR-B1 di permukaan. Hanya metil benzoat digunakan dalam model *in-vivo* kerana hasil fraksi 1 adalah sedikit. Metil benzoat diberikan kepada tikus Sprague-Dawley yang mempunyai hiperkolesterol, selama 28 hari. Berdasarkan darah yang dikeluarkan

selepas 28 hari, tikus menunjukkan profil lipid yang lebih baik di mana HDL meningkat dan LDL dan triglyserida menurun. Serum aminotransferase menunjukkan penurunan nilai berbanding dengan kawalan. Dari histologi hati, kehadiran kolesterol dapat dilihat di dalam sel hati. Titisan kolesterol dinilai melalui kaedah semi-kuantitatif menggunakan sistem pemarkahan mudah dan menunjukkan nilai yang lebih tinggi selepas rawatan selepas dibandingkan dengan kawalan negatif. Dari penemuan ini, metil benzoat menunjukkan keputusan positif kedua-dua kajian *in-vitro* dan *in-vivo* menunjukkan kemampuannya dalam mengurangkan hiperkolesterolemia.