



خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های دو گونه خیار دریایی خلیج فارس

Holothuria leucospilota و *Holothuria parva*فاطمه پیشه‌ورزاد^۱، مرتضی یوسف زادی^{۲*}، احسان کامرانی^۲، ترانه معینی زنجانی^۳، آتوسا علی احمدی^۴، موسی کشاورز^۲^۱گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس^۲گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس^۳مرکز تحقیقات داروسازی و علوم اعصاب، دانشگاه شهید بهشتی، تهران^۴گروه میکروبیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

نوع مقاله:

پژوهشی

چکیده

جانوران دریایی به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه از مهم‌ترین منابع تولیدات طبیعی با منشا فعالیت‌های زیستی محسوب می‌شوند. از جمله این موجودات که بسیاری از ترکیبات آن، با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان، ضد باکتری و ضد التهاب، شناسایی و مطالعه شده خیار دریایی می‌باشد. اگرچه تحقیقات انجام شده در این راستا بر روی گونه‌های خلیج فارس بسیار محدود است. در این مطالعه، خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های (ان-هگزانی، اتیل استاتی و متانولی) چهار اندام از دو گونه‌ی *Holothuria parva* و *H. leucospilota* مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که عصاره‌ی متانولی لوله‌ی گوارش گونه *H. parva* با IC_{50} ۳۶۹/۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر دارای بهترین اثر آنتی‌اکسیدانی بود. در حالیکه عصاره‌ی اتیل استاتی لوله گوارش *H. leucospilota* با IC_{50} ۱۴۵۱/۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر پایین ترین اثر آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. از طرفی عصاره‌های ان-هگزانی اثری در جذب رادیکال‌های آزاد DPPH از خود نشان ندادند. این مطالعه نمایان ساخت که بعضی از اشکال فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های زیستی گونه‌های *H. leucospilota* و *H. parva* وجود دارد.

کلیمات کلیدی:

خیار دریایی

فعالیت زیستی

آنتی‌اکسیدان

خلیج فارس

DPPH

مقدمه

رادیکال‌های آزاد می‌توانند به عنوان مولکول یا بخش‌هایی از مولکول که شامل یک یا تعداد بیشتری از الکترون‌های جفت نشده در اوربیتال‌های مولکولی یا اتمی باشند، تعریف شوند (Halliwell and Gutteridge, 1999). مشاهدات محققان نشان داده است که رادیکال‌های آزاد، خصوصاً گونه‌های اکسیژن‌بازفعال شده (ROS)، در شروع و ترویج فرآیند سرطان دخیل هستند. نقش استرس اکسیداتیو در انواع مختلف سرطان، همچون سرطان‌های ریه، سینه، خون، تخمدان و روده مشخص شده است (Sen et al., 2010). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توانند اثرات درمانی زیادی علیه امراض گوناگون حاصل از استرس اکسیداتیو داشته باشند (Govindarajan et al., 2005). به عبارتی، برخی مطالعات اپیدمیولوژیک اثرات محافظتی رژیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در کاهش ریسک ابتلا به سرطان ثابت می‌کند (Yang et al., 2001).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: morteza110110@gmail.com

در دهه های اخیر، تولیدات طبیعی دریایی دارای جذابیت جهانی برای توسعه محصولات دارویی مختلف در سراسر جهان شده اند. خیارهای دریایی گروه بزرگی از آبزیان را تشکیل می دهند و از نظر رده بندی جزء راسته خارپوستان و رده خیاران دریایی محسوب می شوند. این جاندار بدنی چرم مانند داشته و بیشتر در کف دریاها و یا مناطق بین جزر و مدی زندگی می کند. تا کنون فعالیت های بیولوژیک خیارهای دریایی شامل: خاصیت ضد سرطانی، ضد ویروس، ضد انعقاد، ضد فشار خون، ضد التهاب، ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد تصلب شرایین، ضد تومور و تسریع در بهبود زخم می باشد. دلیل وجود این خواص در خیار دریایی را می توان به حضور موادی مانند؛ ترکیباتی با ساختار شیمیایی گلیکو تریپنئوئید^۱، کندروکتین سولفات^۲، گلوکز آمینو گلیکان (GAGs)^۳، پلی ساکارید سولفات^۴، گلیکو پروتئین^۵، گلیکواسفنگولیپید^۶ و اسیدهای چرب ضروری در خیار دریایی نسبت داد (Bordbar et al., 2011).

خلیج فارس بستر مناسبی برای زیست بسیاری از بی مهره گان مانند خیار دریایی می باشد. لذا در این مطالعه، خواص آنتی اکسیدانی عصاره های (نیمه قطبی و قطبی) چهار اندام (دیواره بدن، لوله گوارش، گناد و درخت تنفسی) دو گونه از خیارهای دریایی خلیج فارس به روش تست بازدارندگی اکسیداسیون (DPPH) مورد آزمایش قرار گرفت. گونه های *H. parva* و *H. leucospilota* در برخی از اندام ها با جذب رادیکال های آزاد محیط آزمایشی، خاصیت آنتی اکسیدانی نشان دادند.

مواد و روش ها

نمونه برداری

نمونه های *H. leucospilota* به کمک غواص و از عمق ۶-۹ متر، از بندر نخیلو، و نمونه های *H. parva*، در هنگام جزر از سواحل بندر لنگه جمع آوری و درون ظرف های بزرگ حاوی آب دریا، با هوادهی مطلوب، به آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه هرمزگان انتقال داده شد.

شناسایی نمونه ها

برای اطمینان از صحت نوع گونه، یک تکه از بافت اپیدرمی نمونه به ضخامت ۱ mm و مساحت ۱ cm² به وسیله تیغ جراحی جدا و در یک لوله آزمایش حاوی ۳ ml مایع سفید کننده، قرار داده شد. پس از ۲۰ دقیقه رسوب سفید رنگی در انتهای لوله جمع گردید. یک قطره از رسوب سفید را روی یک لام پخش کرده، سپس به وسیله میکروسکوپ نوری و با لنز ۱۰ و ۴۰ مشاهده شد. اوسیکل ها با کلید شناسایی FAO در مورد خیارهای دریایی *H. parva* و *H. leucospilota* مورد مقایسه قرار گرفت.

تشریح

نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه به سرعت جزء بندی شده و به قسمت های دیواره بدن، درخت تنفسی، گناد و لوله گوارش تقسیم بندی و در فریز ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. اندام ها به قطعات کوچک و عضلات به تکه های ۱-۲ سانتی متری برش زده شد.

عصاره گیری

نمونه ها پس از تشریح به منظور کارایی و ماندگاری بالاتر به مدت ۲۴-۴۸ ساعت درون دستگاه فریز- درایر خشک و فریز شده و سپس عصاره های آن- هگزانی، اتیل استاتی و متانولی تهیه شدند. نمونه های فریز- درای شده به ارلن حاوی آن- هگزان

¹ Triterpene glycosides

² chondroitin sulfates

³ glycosaminoglycan

⁴ sulfated Polysaccharides

⁵ glycoprotein

⁶ glycosphingolipids

انتقال و به مدت ۴۸ ساعت باقی ماند تا عصاره‌گیری انجام شود. عصاره‌ی استخراج شده، توسط دستگاه روتاری در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. پس از سپری شدن زمان لازم، عصاره خالص به صورت خشک از هر اندام تهیه گردید.

پس از عصاره‌گیری با آن-هگزان و جداسازی ترکیبات غیر قطبی، روی نمونه‌های قبلی اتیل استات ریخته و عصاره‌گیری به روش ذکر شده برای عصاره‌های نیمه قطبی اتیل استاتی و قطبی متانولی نیز انجام گرفت.

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های غیر قطبی، نیمه قطبی و قطبی اندام‌های مختلف گونه‌ی *H. parva* و نیز عصاره‌های غیرقطبی و نیمه قطبی گونه‌ی *H. leucospilota*، به وسیله‌ی سنجش جذب رادیکال‌های آزاد توسط روش DPPH، تخمین زده شد. ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول متانولی از هر یک از نمونه‌ها تهیه شد. عصاره‌ها با غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۲۴۰ و ۳۲۰ $\mu\text{g/ml}$ ، در میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته شده و برای خشک شدن در محیط آزمایشگاه باقی ماند. یک ستون از میکروپلیت به عنوان کنترل با متانول و DPPH پر شد. محلول DPPH با غلظت ۴۰ $\mu\text{g/ml}$ مورد استفاده قرار گرفت. به هر یک از چاهک‌های حاوی عصاره، ۶۳ μl DPPH و ۱۸۷ μl متانول اضافه شد. پس از اضافه نمودن معرف جهت جلوگیری از تاثیر نور بر اثرات آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات معرف، درب پلیت بسته و با فویل پوشانده شد. میکروپلیت به مدت ۵۰-۴۵ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت. پس از آن، جذب نوری تیمارها توسط دستگاه Power wave ثبت گردید. در این آزمایش، آنتی‌اکسیدان سنتزی (Butylated Hydroxy toluene) BHT به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. همه‌ی نمونه‌ها با سه بار تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ثبت مقادیر جذب، میانگین داده‌ها توسط نرم افزار Excel بررسی شد. مقادیر میانگین جذب بلانک از میانگین نمونه‌های متناظر کم شد. سپس میانگین جذب هر غلظت از نمونه و میانگین جذب کنترل (پس از کم کردن میانگین جذب متانول از آن) در فرمول زیر گذاشته شده و با رسم منحنی غلظت‌های مختلف در برابر اعداد متناظر به دست آمده توسط فرمول (Af)، غلظتی از نمونه که در آن ۵۰٪ جذب رادیکال‌های آزاد صورت می‌گرفت تعیین شد. این غلظت که تحت عنوان Inhibition Concentration of 50% (IC50%) هم از آن یاد می‌شود برای مقایسه‌ی نمونه‌ها با یکدیگر استفاده گردید (Ganesan et al., 2011).

$$(\text{Ac}-\text{As}) * 100 / \text{Ac} = \text{AF}$$

جذب کنترل: Ac جذب نمونه: As جذب نهائی: Af

درصد بازدارندگی (%In) توسط نمونه‌ها، به وسیله‌ی معادله زیر به دست آمد:

$$\text{In \%} = (\text{Ab}-\text{As}) * 100 / \text{Ab}$$

As: جذب نمونه Ab: جذب نمونه شاهد

آنالیز آماری

کلیدی داده‌ها در نرم افزار Excel ثبت و محاسبه‌ی IC₅₀ با سنجش رگرسیون انجام شد. میانگین و انحراف از معیار، به کمک نرم افزار SPSS و نیز تفاوت میانگین بین گروه‌های تیماری از طریق آزمون one-way ANOVA و از طریق تست Duncan's multiple range در سطح اطمینان ۰/۹۵ مورد بررسی و آنالیز آماری قرار داده شد. میانگین داده‌ها و انحراف از معیار آن‌ها در هر غلظت با سه بار تکرار مورد تست قرار گرفت.

نتایج

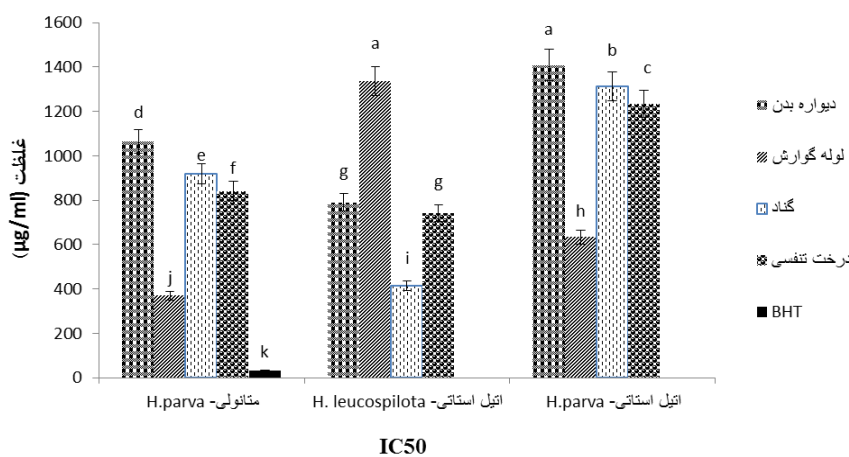
۲۰ نمونه، براساس نوع حلال، اندام و گونه تست شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها برای نشان دادن توانایی جذب مستقیم رادیکال‌های آزاد سنتتیک DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت‌های مورد نیاز از عصاره، جهت جذب ۵۰ درصدی

DPPH رادیکالی تعیین و نتایج در جدول ۱ آورده شد. عصاره های آن- هگزانی هیچ گونه فعالیت آنتی اکسیدانی نشان ندادند. در گونه *H. parva* عصاره های متانولی- آبی اندام ها، دارای قدرت مهار اکسیداسیونی بالاتری نسبت به عصاره های اتیل استاتی بودند. در بین عصاره های متانولی- آبی، بالاترین اثر را لوله گوارش گونه *H. parva* با IC_{50} ۳۶۹/۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر دارا بوده است. در عصاره های اتیل استاتی نیز، بالاترین اثر را گناد *H. leucospilota* با IC_{50} ۴۵۵/۳۹ میکروگرم بر میلی لیتر داشته است. عصاره ی اتیل استاتی لوله گوارش *H. parva* با IC_{50} ۱۴۵۱/۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر پائین ترین قدرت مهار اکسیداسیونی را دارا بوده است. این در حالی است که نمونه ی شاهد BHT با IC_{50} ۳۲/۸۹ میکروگرم بر میلی لیتر دارای توان بالاتری در جذب رادیکال های آزاد DPPH در مقایسه با کلیه ی نمونه ها بوده است.

جدول ۱. مقدار IC_{50} (μg/ml) عصاره های مختلف گونه های خیار دریایی خلیج فارس

گونه	عصاره	متانولی - آبی	اتیل استاتی
<i>H. parva</i>	دیواره بدن	۱۰۰۳/۱۵±۱۹/۴۶	۱۴۲۷/۱۵±۲۸/۵۲
<i>H. parva</i>	لوله گوارش	۳۶۹/۶۴±۱۲/۷۲	۶۱۰/۶۷±۱۳/۵۳
<i>H. parva</i>	گناد	۸۹۰/۱۸±۱۳/۸۸۲	۱۳۳۴/۷۲±۲۹/۳۸
<i>H. parva</i>	درخت تنفسی	۸۳۳/۸۳±۱۲/۷۹	۱۲۳۱/۰۸±۳۵/۹۳
<i>H. leucospilota</i>	دیواره بدن	-	۷۹۰/۲۱±۱۰/۰۳
<i>H. leucospilota</i>	لوله گوارش	-	۱۴۵۱/۳۵±۲۶/۱۰
<i>H. leucospilota</i>	گناد	-	۴۵۵/۳۹±۲۶/۵۱
<i>H. leucospilota</i>	درخت تنفسی	-	۷۶۱/۹۰±۱۵/۶۸
BHT	-	-	۳۲/۸۹±۱

نتایج تست ANOVA (شکل ۱) تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) را در IC_{50} عصاره های اندام های مختلف هر دو گونه خیار دریایی نشان می دهد. بررسی آماری نتایج بیانگر این بود که، قدرت مهار اکسیداسیونی همه ی نمونه های خیار دریایی با افزایش غلظت رابطه ی مستقیم داشته و به میزان غلظت وابسته است. در حالیکه این رابطه در نمونه شاهد صدق نکرده و با افزایش غلظت میزان توانایی جذب رادیکال های آزاد تفاوت چندانی نشان نداد.



شکل ۱. قدرت مهار ۵۰ درصدی عصاره های نیمه قطبی و قطبی اندام های دو گونه خیار دریایی خلیج فارس و آنتی اکسیدان سنتزی BHT. آنتنکها انحراف از معیار را نشان می دهند. اختلاف های معنی دار توسط حروف متفاوت براساس آزمون Duncan's Post Hoc نشان داده شده است ($P < 0.05$).

بحث

رادیکال‌های آزاد، مولکول‌هایی هستند که دارای الکترون‌های جفت نشده در خارجی‌ترین لایه‌ی خود بوده و لذا بسیار بی‌ثبات و واکنش‌پذیر هستند. انباشتگی مقادیری از عوامل اکسیداسیون، خصوصاً گونه‌های اکسیژن‌واکنشی (ROS)، در بدن انسان تخریب DNA و سایر اندامک‌های سلول را که خود آغازگر سرطان است موجب می‌شود (Valko et al., 2007). در مقابل، آنتی‌اکسیدان‌ها، رادیکال‌های آزاد را به وسیله‌ی دادن یکی از الکترون‌های خود به آن‌ها خنثی کرده و از اکسیداسیون مولکول‌های زیستی جلوگیری به عمل می‌آورند. بنابراین، مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی برای محافظت بدن انسان‌ها از انواع سرطان و سایر بیماری‌هایی که به صورت غیرمستقیم با استرس اکسیداسیونی به وجود می‌آید، توصیه می‌شود. ارگانسیم‌های دریایی دارای بسیاری از ترکیبات با خاصیت سمیت سلولی می‌باشند که در زمینه‌ی ضد سرطان کشف شده‌اند (Govindarajan et al., 2005). همچنین، استفاده از داروهای سیتوتوکسیک در حال حاضر تنها راه درمان حالت‌های سرطان متاستاز می‌باشد (Andrianasolo et al., 2007).

لذا بررسی خواص بیولوژیک گونه‌های خیار دریایی جهت دستیابی به پیش‌ماده‌های داروهای بیولوژیک، می‌تواند مسیر مناسبی برای توسعه‌ی صنعت داروسازی باشد. در این حوزه تحقیقاتی در حال انجام است که می‌توان به بررسی خواص ضد سرطان گونه‌ی *H. leucospilota* با اثر بر ناپلی آرتمی، که توسط mokhlesi و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد، اشاره نمود. به منظور بررسی دقیق‌تر خواص آنتی‌اکسیدانی دو گونه از خیارهای دریایی خلیج فارس، این سری از آزمایشات مورد بررسی قرار گرفت.

در روش DPPH که برای سنجش اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، رادیکال‌های DPPH محلول بنفش را در حلال متانول تولید می‌کنند که در صورت وجود مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی به رنگ زرد کاهش پیدا می‌کند. مقدار کاهش رنگ بنفش متناسب با قدرت آنتی‌اکسیدانی مواد تست شده می‌باشد، بنابراین، تست DPPH برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات طبیعی و سنتزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Blois, 1958; Abdille et al., 2005).

در گونه‌ی *H. parva*، عصاره‌ی متانولی لوله‌گوارش با IC_{50} (μg/ml) ۳۷۰، بالاترین اثر آنتی‌اکسیدانی را داشته، در حالیکه، عصاره‌ی اتیل‌استاتی دیواره بدن این گونه با IC_{50} (μg/ml) ۱۴۲۷ پایین‌ترین اثر را دارا بوده است و نیز عصاره‌های آن-هگزانی آن هیچ‌گونه خاصیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان نداد.

عصاره‌ی اتیل‌استاتی گند *H. leucospilota* با IC_{50} (μg/ml) ۴۵۵، بیشترین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد را دارا بوده و عصاره‌ی اتیل‌استاتی لوله‌گوارش با IC_{50} (μg/ml) ۱۴۵۱ کمترین میزان را نشان داده است، در این گونه نیز عصاره‌های آن-هگزانی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نداشتند.

ترکیبات فنولی بخش کاملی از رژیم غذایی انسان را تشکیل داده و بزرگ‌ترین نفع رایج آن فعالیت‌های ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد (Dai and Mumpe, 2010). غذای روزانه‌ی خیارهای دریایی از فیتوپلانکتون‌ها و قسمت‌هایی از ماکرو جلبک‌ها است که غنی از ترکیبات فنولی می‌باشند (Ridzwan, 2007). بنابراین، انتظار می‌رود که این ترکیبات و مشتقات آن‌ها در بافت‌های خیارهای دریایی یافت شود. اگرچه، مطالعات اندکی برای اثبات حضور ترکیبات فنولی در بی‌مهرگان دریایی، به خصوص گونه‌های خیار دریایی انجام شده است. سطوح کلی فنول و فلاونوئیدها از خیار دریایی اقیانوس اطلس، *Cucumaria frondosa*، توسط Mamelona و همکارانش در سال ۲۰۰۷ گزارش شد. Althunibat و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۳ عصاره‌های آلی و آبی دو گونه خیار دریایی *Stichopus horrens* و *Holothuria eduli* را مورد آزمایش قرار دادند که، نتایج آن‌ها تأثیر بالاتر عصاره‌های قطبی آب دوست که با آب عصاره‌گیری شده بودند را نسبت به عصاره‌های آلی نشان داد. همچنین این محققین در سال ۲۰۰۹ اثرات آنتی‌اکسیدانی مایع سلومیک و دیواره بدن گونه‌های خیار دریایی مالزیایی را گزارش نمودند. Hawa و همکاران در سال ۱۹۹۹ از بررسی متابولیت‌ها و مواد به دست آمده از خیار دریایی، به اثرات آنتی‌اکسیدانی مایع احشائی جنس *Stichopus badionotus* و *Bohadschia mamorata itiensis* اشاره نمودند که می‌توان از آن به عنوان یک منبع مناسب و در دسترس برای نیاز انسان در ساخت بسیاری از داروها نام برد.

این مطالعه وجود سطوحی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی را در دو گونه از خیارهای دریایی خلیج فارس، *H. parva* و *H. leucospilota* آشکار نمود که از این میان ترکیبات قطبی موجود در عصاره های آبی- متانولی توانایی بالاتری نسبت به عصاره‌های غیرقطبی و نیمه قطبی در مهار رادیکال‌های آزاد مورد آزمایش نشان دادند. لذا، جداسازی و شناسایی ترکیبات فعال موجود در این عصاره ها جهت دستیابی به پیش ماده های دارویی دریایی با خواص آنتی اکسیدانی پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به منظور حمایت از اجرای این تحقیق (کد: ۹۲۰۴۱۲۰۳).

منابع

- Abdille, M., Singh, R., Jayaprakasha, G., Jena, B. 2005. Antioxidant activity of the extracts from *Dilleniaindica* fruits. *Food Chemistry*. 90: 891- 896.
- Andrianasolo, E.H., Goeger, D., Gerwick, W.H. 2007. Mitsoamide: A cytotoxic linear lipopeptide from the Madagascar marine cyanobacterium *Geitlerinema* sp. *Pure and Applied Chemistry*. 79: 593- 602
- Althunibat, O.Y., Ridzwan, B.H., Taher, M., Daud, J.M., Jauhari Arief Ichwan, S., Qaralleh, H. 2013. Antioxidan and cytotoxic properties of two sea cucumber, *Holothuria edulis* Lesson and *Stichopus horrens* Selenka. *Acta Biologica Hungarica*. 64: 10-20.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 4617: 1199-1200.
- Bordbar, S., Anwar, F., Saari, N. 2011. High- value components and bioactives from sea cucumber for functional foods. *Marine Drugs*. 9: 1761-1895.
- Dai, J., Mumpe, R.J. 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.
- Ganesan, P., Suresh Kumar, K., Subba Rao, P.V. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12: 73-78.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. New York.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P. 2005. Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 165-178.
- Hawa, I., Zulaikah, M., Jamalodin, M., Zainal Abidin, A.A., Kaswandi, M.A., Ridzwan, B.H. 1999. The potential of the coelomic fluid in sea cucumber as an antioxidant. *Malaysian Journal of Nutrition*. 5: 55-59.
- Mamelona, J., Pelletier, E.M., Lalancette, K.G., Legault, J., Karboune, S., Kermasha, S. 2007. Quantification of phenolic and antioxidant capacity of Atlantic seacucumber, *Cucumariafrondosa*. *Food Chemistry*. 104: 1040-1047.
- Ridzwan, B.H. 2007. *Sea cucumber: The Malaysian Heritage*. Research Centre, IIUM, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B. 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutics*. 3: 93-100.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39: 44-84.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*. 21: 381-406.