

PENGARUH EKSTRAK AQUEOUS CLITORIA TERNATEA TERHADAP KERUSAKAN HISTOLOGI OTAK DAN GANGGUAN MEMORI PADA TIKUS WISTAR TERINDUKSI DIET TINGGI LEMAK

I Gede Aswin Parisya Sasmana¹, I Komang Wira Ananta Kusuma¹, I Gede Arya Diva Dhananjaya¹, Anggi Amanda Triana Devy¹, Desak Made Wihandani²

¹. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Denpasar, Bali

². Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Denpasar, Bali.

Corresponding author: Desak Made Wihandani

e-mail: dmwihandani@unud.ac.id

ABSTRAK

Pendahuluan: Diet tinggi lemak dapat menyebabkan berbagai macam kondisi salah satunya adalah obesitas. Ketidakseimbangan profil lipid secara langsung berkontribusi pada stress oksidatif kronis sehingga dapat mempengaruhi struktur dan fungsi otak. Manifestasi klinis dari gangguan fungsi otak yaitu penurunan memori. *Clitoria ternatea* L. mengandung flavonoid dan polifenol yang berperan sebagai antioksidan sehingga dapat mencegah kerusakan organ khususnya otak maupun gangguan memori. **Tujuan:** mengetahui efek pemberian ekstrak air *Clitoria ternatea* L. terhadap gambaran histologis otak dan gangguan memori tikus dengan induksi diet tinggi lemak. **Metode:** Jenis penelitian ini adalah true experimental post-test only menggunakan 25 ekor tikus yang dibagi menjadi lima kelompok yaitu diet normal (ND), diet tinggi lemak (HFD), dan kelompok perlakuan (HFD+CTE250; HFD+CTE500; HFD+CTE750). Ekstrak *Clitoria ternatea* L. diperoleh dengan metode ekstrak air. Berat badan pasca perawatan, profil lipid (kolesterol, trigliserida, HDL-C, dan LDL), fungsi memori (uji labirin Y), dan gambaran histologis otak diukur dan dianalisis. **Hasil:** Hasil penelitian ini menunjukkan penurunan sel hipokampus yang signifikan pada kelompok dengan HFD dibandingkan dengan kelompok HFD+CT750 (MD: -82.33; 95% CI (-128.87 hingga -35.79); p=0,03). Kondisi ini juga diperparah dengan kejadian oklusi pembuluh darah yang dapat menghambat peredaran darah pada otak tikus kelompok HFD. Memori spasial tikus dan jumlah entri pada uji Y-maze menunjukkan terdapat penurunan jumlah entri dan memori spasial yang signifikan pada kelompok HFD+CT250 (MD: 37,70; 95% CI (18,38-57,02); p=0,001). **Simpulan:** ekstrak air *Clitoria ternatea* L. secara signifikan mempengaruhi gambaran histologis otak dan gangguan memori tikus dengan induksi diet tinggi lemak.

Kata Kunci: *Clitoria ternatea* L., Histologis otak, gangguan memori.

ABSTRACT

Introduction: A high-fat diet can cause various conditions, one of which is obesity. An imbalance in lipid profile directly contributes to chronic oxidative stress it can affect the structure and function of the brain. The clinical manifestation of impaired brain function is memory loss. *Clitoria ternatea* L. contains flavonoids and polyphenols which act as antioxidants so that they can prevent damage to organs, especially the brain and memory disorders. **Objective:** to determine the effect of *Clitoria ternatea* L. aqueous extract on the histological appearance of the brain and memory impairment of rats induced by a high-fat diet. **Methods:** This type of research was a true experimental post-test only using 25 rats which were divided into five groups: normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and treatment group (HFD+CTE250; HFD+CTE500; HFD+CTE750). *Clitoria ternatea* L. extract was obtained by the aqueous extract method. Post-treatment body weight, lipid profile (cholesterol, triglyceride, HDL-C, and LDL), memory function (Y maze test), and histological appearance of the brain were measured and analyzed. **Results:** The results of this study showed a significant decrease in hippocampal cells in the group with HFD compared to the HFD+CT750 group (MD: -82.33; 95% CI (-128.87 to -35.79); p=0.03). This condition was also exacerbated by occlusion of blood vessels which could inhibit blood circulation in the brains of the HFD group rats. Rat spatial memory and a number of entries in the Y-maze test showed a significant decrease in the number of entries and spatial memory in the HFD+CT250 group (MD: 37.70; 95% CI (18.38-57.02); p=0.001). **Conclusion:** *Clitoria ternatea* L. aqueous extract significantly affects the histological appearance of the brain and memory impairment of rats by induction of a high-fat diet.

Keywords: *Clitoria ternatea* L., Histology of the brain, memory disorders.

PENDAHULUAN

Saat ini, masyarakat memiliki kecenderungan untuk memiliki tingkat stres dan kesibukan yang tinggi sehingga hal ini akan berpengaruh terhadap pola makan yang berubah dan dicirikan dengan diet tinggi lemak.¹ Diet tinggi lemak dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan berbagai macam kondisi seperti hiperinsulinemia sehingga terjadi peningkatan penyimpanan nutrient dan memicu terjadinya obesitas.² Obesitas merupakan salah satu faktor risiko mayor dari berkembangnya berbagai penyakit metabolik seperti diabetes tipe 2, stroke, gagal ginjal kronis, hipertensi bahkan sindrom metabolik.³ Pola diet tinggi lemak dapat memicu penimbunan lemak dalam jaringan subkutan, disekitar organ tubuh dan terkadang terjadi perluasan sampai dengan jaringan organ.⁴

Obesitas yang diinduksi oleh diet tinggi lemak dikarakterisasikan sebagai produksi adipokin yang tidak normal dan aktivasi sitokin proinflamasi yang berlebihan.⁵ Inflamasi kronis yang disebabkan oleh obesitas juga ditandai dengan infiltrasi makrofag menuju jaringan adiposa.⁶ Kemudian, resistensi insulin dapat mempengaruhi berbagai organ sistemik tidak terkecuali otak.⁷ Ketidakseimbangan profil lipid yang secara langsung dapat berkontribusi pada stres oksidatif kronis akan mempengaruhi struktur dan fungsi otak. Salah satu manifestasi klinis dari adanya gangguan fungsi otak yaitu penurunan memori.⁸ Dalam beberapa studi menunjukkan bahwa penurunan memori juga dapat dijumpai pada pola diet tinggi lemak serta berkorelasi dengan kejadian Alzheimer dan demensia.^{9,10}

Beberapa studi telah mengkaji mengenai efek negatif dari diet tinggi lemak, begitu juga dengan penelitian yang dapat mengurangi efek negatif yang ditimbulkan dari diet tinggi lemak. Salah satu metode pencegahan yang potensial untuk dikembangkan dalam mengurangi dampak negatif diet tinggi lemak yaitu bunga telang (*Clitoria ternatea L.*). Bunga telang mengandung flavonoid dan polifenol yang tinggi dan dapat berperan sebagai antioksidan.¹¹ Ketika kondisi obesitas, terjadi stress oksidatif yang dapat dihambat oleh antioksidan, sehingga berbagai mediator inflamasi maupun lipid peroksida yang merupakan produk hasil dari proses oksidasi asam lemak bebas dan memiliki sifat radikal bagi sel dan komponen sel lainnya serta kerusakan organ khususnya otak maupun berkurangnya fungsi memori dapat dicegah.¹² Berdasarkan hal inilah, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak air bunga telang terhadap gambaran histologis otak dan gangguan memori tikus dengan induksi diet tinggi lemak.

1. BAHAN DAN METODE

2.1 Persiapan Bahan dan Pembuatan Ekstrak

Secara singkat, 100 g bunga *Clitoria ternatea* kering diperoleh dari beberapa daerah di Buleleng, Bali-Indonesia. Kelopak bunga dihaluskan dengan hammer mill crusher dan direbus dengan 500 mL air suling selama 30 menit. Larutan ekstrak dibiarkan dingin dengan pengocokan yang sering sebelum sonikasi selama 15 menit. Ekstrak disaring vakum menggunakan nilon setidaknya tiga kali dan marc dibuang. Akhirnya, ekstrak air

Clitoria ternatea (CTE) dibekukan dengan liofilisasi dan disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan.

2.2 Desain Studi Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus Wistar jantan, berumur 8-12 minggu dengan berat badan rata-rata 150 gram. Hewan coba yang digunakan adalah 25 ekor hewan berdasarkan formula Federer yang dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (tikus sehat; ND), kelompok kontrol positif (dengan diet tinggi lemak saja; HFD), kelompok perlakuan 1 (Diet tinggi lemak + 250mg/kgBB CTE; HFD+CTE250), kelompok perlakuan 2 (Diet tinggi lemak + 500mg/kgBB CTE; HFD+CTE500), dan kelompok perlakuan 3 (Diet tinggi lemak + 750mg/kgBB CTE; HFD+CTE750). Kelompok kontrol negatif diberikan standar sebanyak 25 gram/tikus/hari dan diberi minum ad libitum. Kelompok perlakuan dan kontrol positif diberi diet tinggi lemak (diet standar 70%, kuning telur bebek 20%, dan minyak babi 10%). Tikus ditempatkan pada kandang percobaan (3 ekor tikus per kandang), pada ruangan dengan suhu 24 ± 1 °C, kelembaban $55\% \pm 5\%$, dan siklus terang/gelap 12 jam. Setelah 10 minggu pemberian diet tinggi lemak, kelompok perlakuan mendapatkan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) sesuai dosis selama 3 minggu. Untuk kelompok kontrol positif, diberikan induksi diet tinggi lemak selama total 13 minggu. Ekstrak yang diberikan sebelumnya akan dilarutkan dengan akuades sesuai konsentrasi yang diberikan.

2.4 Pemeriksaan dan Pengambilan Sampel

Pemeriksaan kapasitas memori dari tikus dilakukan berdasarkan penelitian oleh Ajayi, dkk (2021), menggunakan bantuan *Y-maze*. Setiap tikus diletakkan pada lengan A secara bergantian untuk menjelajahi ketiga lengan dari *T-maze* secara bebas selama 5 menit. Jumlah dan urutan lengan yang dimasuki akan dicatat dan dikalkulasikan. Penguji akan membersihkan *Y-maze* dengan etanol 70% untuk menghilangkan bekas hewan coba. Pengambilan sampel otak akan diawali dengan pembiusan ketamin 0,5 mL kemudian dislokasi serviks untuk euthanasia hewan coba. Sampel organ otak diambil dan ditimbang, kemudian disimpan dalam *buffer* formalin 10% untuk pemeriksaan histologi pada masing-masing 1 buah sampel di setiap kelompok. Preparat dibuat dengan pengecatan *Hematoxylin-Eosin* (H&E).¹³

2.5 Pemeriksaan Histologis

Preparat diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran bertahap 40x, 100x, dan 400x. Gambar diambil menggunakan kamera mikroskop dan software OptiLab 2.1 yang dilakukan pada 8 lapang pandang untuk setiap preparat secara acak. Pengukuran masing-masing variabel dilakukan menggunakan software ImageJ menggunakan menu straight line untuk mengukur ketebalan hipokampus dan manual count untuk menghitung sel hipokampus.

2.6 Analisis Statistik

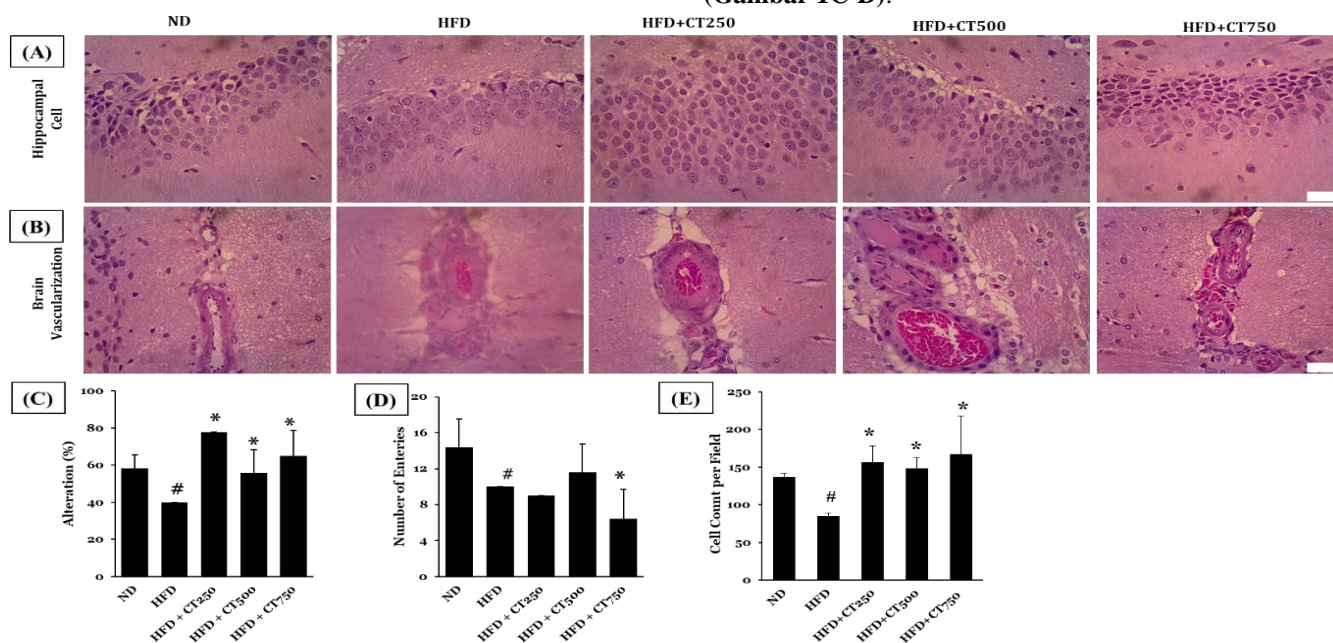
Data kualitatif akan dirata-ratakan dari masing-masing kelompok kemudian dianalisis dengan *software* SPSS 25.0. Data yang memenuhi persyaratan dianalisis dengan uji *One-way* ANOVA dilanjutkan dengan uji *post hoc*. Jika data penelitian tidak memenuhi persyaratan maka akan dilakukan uji Mann-Whitney. Hubungan yang signifikan ditentukan dengan nilai $p < 0,05$.

2. HASIL

Analisis fitokimia menunjukkan kandungan total flavonoid dan fenolik ekstrak air *Clitoria ternatea* masing-masing mencapai 1771,39 mg/100g dan 2039,92 mg/L GAEAC. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis

dilakukan pada otak, dan fungsi memori tikus dinilai menggunakan uji *Y-maze*.

Pada **Gambar 1**, ditampilkan gambaran histologi segmen hipokampus otak tikus yang kemudian dianalisis dengan penghitungan sel. Hasil penelitian ini menunjukkan penurunan sel hipokampus yang signifikan pada kelompok dengan HFD dibandingkan dengan kelompok HFD+CT750 (MD: -82.33; 95% CI (-128.87 hingga -35.79); $p=0,03$). Kondisi ini juga diperparah dengan kejadian oklusi pembuluh darah yang dapat menghambat peredaran darah pada otak tikus kelompok HFD (**Gambar 1B**). Hasil analisis memori spasial tikus dan jumlah entri pada uji *Y-maze* menunjukkan terdapat penurunan jumlah entri dan memori spasial yang signifikan pada kelompok HFD+CT250 (MD: 37,70; 95% CI (18,38-57,02); $p=0,001$) (**Gambar 1C-D**).



Gambar 1. Pemeriksaan mikroskopis jaringan otak. Gambaran histologi hipokampus untuk penghitungan sel dalam pembesaran 400x (A). Gambaran histologi vaskularisasi otak dalam pembesaran 400x (B). Kuantifikasi dan perbandingan persentase alterasi memori spasial (C) dan jumlah entri pada cabang *Y-maze* (D) dari setiap kelompok. Kuantifikasi *hippocampal cell-count* (E). Panjang *white bar* 50 μ m. # $p < 0,05$ vs kelompok ND; * $p < 0,05$ vs kelompok HFD

3. PEMBAHASAN

Hasil uji fitokimia dari penelitian ini untuk kandungan fenolik ekstrak aqueous *Clitoria ternatea* adalah 2039,92 mg/L. Pada penelitian lain yang melakukan uji fitokimia pada ekstrak metanol bunga *Clitoria ternatea*, ditemukan kandungan fenolik $105,40 \pm 2,47$ mg/g ekuivalen dengan asam galat. Konsentrasi fenol dan flavonoid telah dipelajari secara luas dan menunjukkan efek antioksidan yang kuat dalam tubuh. Kemampuan ekstrak *Clitoria ternatea* untuk melawan radikal bebas disebabkan oleh senyawa fenolik dan flavonoid yang dikandungnya. Hal tersebut dibuktikan dengan kandungan fenol yang tinggi berdasarkan studi

fitokimia.¹⁴ Selain ekstrak *Clitoria ternatea*, ekstrak bunga Kecombrang (*Etligeria elatior* Jack) dapat digunakan sebagai agen hipolipidemik pada tikus Wistar yang diinduksi diet tinggi lemak. Kandungan fenolik ekstrak bunga kecombrang adalah $39,06 \pm 1,59$ mg GAE/G.¹⁵ Hal ini menunjukkan bahwa kandungan fenolik ekstrak *Clitoria ternatea* lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak bunga Kecombrang.

Obesitas yang disebabkan oleh diet tinggi lemak dapat merusak kinerja hippocampus dan memori spasial.¹⁶ Diet tinggi lemak telah ditemukan menyebabkan penurunan neuron hippocampal. Hasil penelitian tentang efek HFD pada hippocampus konsisten dengan Lindqvist (2006) yang menunjukkan bahwa pemberian HFD selama empat minggu

pada tikus Sprague-Dawley jantan merusak neurogenesis hippocampal dengan secara signifikan mengurangi jumlah sel yang baru terbentuk. di dentate gyrus hipokampus. ($p < 0,05$). Hal ini diduga karena peningkatan kadar kortikosteron serum, yang menghambat neurogenesis hippocampal pada kelompok HFD.¹⁷ Pemberian HFD selama 2 bulan mengurangi kepadatan neuronal hippocampal in vivo ($p < 0,005$), disertai kerusakan mitokondria dan retikulum endoplasma memanjang. Hal ini diperkirakan karena peningkatan kadar C-Fos, yang terlibat dalam jalur pensinyalan yang berkaitan dengan stres oksidatif dan kematian neuron.¹⁷

Dalam penelitian ini, pemulihan kehilangan neuron hippocampal dicapai dengan pemberian ekstrak aqueous *Clitoria ternatea*. Kandungan fenolik (TPC) dan kandungan flavonoid total (TFC) ekstrak dilaporkan sebesar 53,62 mg GAE/g dan 34,01 mg QE/g.¹⁸ Studi ini menemukan bahwa persentase perubahan memori spasial lebih sedikit pada kelompok HFD dibandingkan pada kelompok ND $p < 0,05$. Pada kelompok perlakuan persentase perubahan memori spasial lebih tinggi dibandingkan kelompok HFD, namun persentase perubahan memori spasial tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan 1 yang mendapat ekstrak *Clitoria ternatea* 250 mg/kg berat badan, disusul kelompok ketiga. Jumlah cabang *Y-labyrinth* terlihat menurun pada kelompok HFD dibandingkan dengan kelompok ND. Pada kelompok perlakuan, peningkatan percabangan *Y-labyrinth* terbesar terjadi pada kelompok yang diberikan ekstrak *Clitoria ternatea* 500 mg/kg berat badan. Tes *Y-maze* adalah tes yang berkaitan dengan pembelajaran spasial dan memori pada tikus melalui aktivitas tikus dalam menjelajahi lingkungan baru.¹⁹ Hal ini serupa dengan beberapa penelitian lain yang menunjukkan bahwa ekstrak akar *Clitoria ternatea* dapat secara signifikan meningkatkan memori spasial dan kemampuan belajar. pada tikus dengan dosis 100 mg/kg. Studi eksperimental lain juga menemukan bahwa ekstrak air-metanol *Clitoria ternatea* dapat meningkatkan daya ingat.²⁰ Hubungan terbalik antara HFD dan kinerja memori spasial pada tikus dapat dikaitkan dengan stres oksidatif. Hal tersebut karena obesitas dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas dan stres oksidatif pada otak hewan pengerat. Senyawa dalam *Clitoria ternatea* dapat bertindak sebagai antioksidan dan membantu meningkatkan memori spasial pada tikus yang diberi diet tinggi lemak.²¹

Khamse, dkk (2015) menunjukkan bahwa fenol dapat mencegah kerusakan saraf hippocampis pada CA1 dan CA3 pada tikus Wistar. Ekspresi Bax dan caspase-3; MDA, ROS dan level Ca^{2+} intraseluler.²² Hal ini juga dilaporkan oleh Dong, dkk (2017) yang menemukan efek neuroprotektif quercetin terhadap neurotoksisitas yang diinduksi D-galaktosa dengan mengaktifkan jalur pensinyalan Nrf2-ARE di hippocampus.^{23,24}

Pemberian HFD pada tikus selama 28 hari dapat menginduksi dislipidemia dengan peningkatan yang signifikan pada trigliserida ($p < 0,01$) dan kolesterol low-density lipoprotein (LDL-C) ($p < 0,01$).²⁵ Hal tersebut dapat secara signifikan meningkatkan risiko stroke pada pasien

dengan diabetes tipe 2 ($p < 0,05$).²⁶ He, dkk (2016) menemukan bahwa HFD dapat mempengaruhi morfologi mikrovaskular serebral tikus, mengakibatkan penurunan kepadatan mikrovaskular, disfungsi permukaan endotel, penurunan aliran darah, dan peningkatan agregasi trombosit.²⁷

Dalam penelitian ini, oklusi serebrovaskular tikus HFD dapat diperbaiki dengan ekstrak aqueous *Clitoria ternatea*. Zat dalam ekstrak diduga berkontribusi terhadap hasil ini adalah flavonoid, yang mampu meningkatkan bioavailabilitas NO dan mengoptimalkan sirkulasi darah.²⁷ Selain itu, kandungan quercetin dalam ekstrak ini dapat meringankan gejala aterosklerosis yang dapat terjadi pada pembuluh otak dengan meningkatkan ekspresi ABCA1, PPAR γ dan LXR- α dan menurunkan ekspresi PCSK9 dan CD36, sehingga terjadi penurunan TC dan LDL.²⁸ Fenol yang terkandung dalam ekstrak aqueous *Clitoria ternatea* telah terbukti mencegah perkembangan lesi aterosklerotik dengan secara signifikan menghambat pembentukan plak fibrosa in vivo.²⁹

4. SIMPULAN DAN SARAN

Clitoria ternatea merupakan tumbuhan yang memiliki banyak manfaat bagi tubuh, terutama pada kondisi obesitas. Ekstrak *Clitoria ternatea* dapat membantu memperbaiki beberapa organ pada tikus Wistar yang diinduksi dengan diet tinggi lemak. Kandungan flavonoid dan fenol yang melimpah pada ekstrak bunga tumbuhan tersebut berpotensi memperbaiki kerusakan organ dan alterasi memori spasial pada tikus yang diberi diet tinggi lemak. Flavonoid dan fenol berperan sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas dan stres oksidatif. Penelitian ini mengamati memori spasial dan gambaran makroskopis dan mikroskopis otak pada tikus yang diberi diet tinggi lemak dan ekstrak air bunga *Clitoria ternatea*. Ekstrak ini dapat memperbaiki gangguan memori yang terjadi pada tikus dimana terjadi peningkatan persentase perubahan memori spasial dan entri cabang *Y-maze* pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok HFD. Selain itu, pemberian ekstrak air *Clitoria ternatea* juga dapat menjaga dan memulihkan jumlah sel pada hipokampus yang berkaitan erat dengan fungsi memori spasial tikus, serta mencegah proses formasi oklusi pada vaskularisasi otak. Oleh karena itu, ekstrak *Clitoria ternatea* berpotensi memperbaiki kerusakan histologi hipokampus dan gangguan memori pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak.

ACUAN REFERENSI

1. Scott KA, Melhorn SJ, Sakai RR. Effects of Chronic Social Stress on Obesity. *Curr Obes Rep*. 2012 Mar;1(1):16–25.
2. Barclay JL, Shostak A, Leliavski A, Tsang AH, Jöhren O, Müller-Fielitz H, et al. High Fat Diet-Induced Hyperinsulinemia and Tissue Specific Insulin Resistance in Cry-deficient Mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013

- May;304(10):E1053-63.
3. Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, Lee Y, Lee DH, Kim HJ, et al. Resveratrol Attenuates Obesity Associated Peripheral and Central Inflammation and Improves Memory Deficit in Mice Fed a High-Fat Diet. *Diabetes*. 2012;61(6):1444–54.
 4. Poret JM, Souza-Smith F, Marcell SJ, Gaudet DA, Tzeng TH, Braymer HD, et al. High Fat Diet Consumption Differentially Affects Adipose Tissue Inflammation and Adipocyte Size in Obesity-Prone and Obesity-Resistant Rats. *Int J Obes (Lond)*. 2018 Mar;42(3):535–41.
 5. Cao H. Adipocytokines in Obesity and Metabolic Disease. *J Endocrinol*. 2014 Feb;220(2):T47-59.
 6. Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent Advances in Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Aug;4:93.
 7. Freeman LR, Haley-Zitlin V, Rosenberger DS, Granholm A-C. Damaging Effects Of a High-Fat Diet To The Brain and Cognition: A Review of Proposed Mechanisms. *Nutr Neurosci*. 2014 Nov;17(6):241–51.
 8. Yaghi S, Elkind MS V. Lipids and Cerebrovascular Disease: Research and Practice. *Stroke*. 2015 Nov;46(11):3322–8.
 9. Knight EM, Martins IVA, Gümüşgöz S, Allan SM, Lawrence CB. High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer’s disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiol Aging*. 2014 Aug;35(8):1821–32.
 10. Kothari V, Luo Y, Tornabene T, O’Neill AM, Greene MW, Geetha T, et al. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(2):499–508.
 11. Jadhav (Rathod) V, Kharade S, Mahadkar S. Evaluation of antioxidant potential of *Clitoria ternatea* L. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013 Jan;5:595–9.
 12. Chang E, Kim CY. Lipid Peroxidation and Antioxidant Activities of the Aqueous Rhizome Extract of *Rheum officinale* Baillon. *J Food Qual*. 2018;2018.
 13. Ajayi AM, John KA, Emmanuel IB, Chidebe EO, Adedapo ADA. High-fat diet-induced memory impairment and anxiety-like behavior in rats attenuated by peel extract of *Ananas comosus* fruit via atheroprotective , antioxidant and anti-inflammatory actions. *Metab Open [Internet]*. 2021;9:100077. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.metop.2021.100077>
 14. Nithianantham K, Ping KY, Latha LY, Jothy SL, Darah I, Chen Y, et al. Evaluation of hepatoprotective effect of methanolic extract of *Clitoria ternatea* (Linn.) flower against acetaminophen-induced liver damage. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2013;3(4):314–9.
 15. Syarif RA, Sari F, Ahmad AR, Indonesia UM, Urip J, Km S. RIMPANG KECOMBRANG (*Etilingera elator* Jack.) AS A PHENOLIC SOURCE. *J Fitofarmaka Indones*. 2016;2(2):102–6.
 16. Underwood EL, Thompson LT. A high-fat diet causes impairment in hippocampal memory and sex-dependent alterations in peripheral metabolism. *Neural Plast*. 2016;2016.
 17. Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol*. 2006 Dec;13(12):1385–8.
 18. Cahyaningsih E, Yuda PESK, Santoso P. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS. *J Ilm Medicam*. 2019;5(1):51–7.
 19. Zghari O, Rezqaoui A, Ouakki S, Lamtai M, Chaibat J, Mesfioui A, et al. Effect of Chronic Aluminum Administration on Affective and Cognitive Behavior in Male and Female Rats. *J Behav Brain Sci*. 2018;08(04):179–96.
 20. Gollen B MJ and GP. *Clitoria ternatea* Linn: A Herb with Potential Pharmacological Activities: Future Prospects as Therapeutic Herbal Medicine. *J Pharmacol Reports*. 2018;3(141):1–8.
 21. Sepehri H, Hojati A, Safari R. Effect of bitter melon on spatial memory of rats receiving a high-fat diet. *J Exp Pharmacol*. 2019;11:115–9.
 22. Khamse S, Sadr SS, Roghani M, Hasanzadeh G, Mohammadian M. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharm Biol*. 2015;53(12):1818–25.
 23. Zaplatic E, Bule M, Shah SZA, Uddin MS, Niaz K. Molecular mechanisms underlying protective role of quercetin in attenuating Alzheimer’s disease. *Life Sci*. 2019 May;224:109–19.
 24. Dong F, Wang S, Wang Y, Yang X, Jiang J, Wu D, et al. Quercetin ameliorates learning and memory via the Nrf2-ARE signaling pathway in d-galactose-induced neurotoxicity in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Sep;491(3):636–41.
 25. Jia YJ, Liu J, Guo YL, Xu RX, Sun J, Li JJ. Dyslipidemia in rat fed with high-fat diet is not associated with PCSK9-LDL-receptor pathway but ageing. *J Geriatr Cardiol*. 2013;10(4):361–8.
 26. Fan D, Li L, Li Z, Zhang Y, Ma X, Wu L, et al. Effect of hyperlipidemia on the incidence of cardio-cerebrovascular events in patients with type 2 diabetes. *Lipids Health Dis*. 2018 Dec;17(1):102.

27. He Y, Han D, Shi M, Sun Z, Xie J, Zhu J, et al. Effects of high-fat diet on the morphological characteristics of cerebral microvasculature without hyperlipidemia in Wistar rat. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016;9(11):11752–9.
28. Jia Q, Cao H, Shen D, Li S, Yan L, Chen C, et al. Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of PCSK9, CD36, PPAR γ , LXR α and ABCA1. *Int J Mol Med.* 2019 Jul;44(3):893–902.
29. Che Idris CA, Karupaiah T, Sundram K, Tan YA, Balasundram N, Leow S-S, et al. Oil palm phenolics and vitamin E reduce atherosclerosis in rabbits. *J Funct Foods.* 2014 Mar;7(1):541–50.