

TOTAL FLAVONOID DAN EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI KELOR (*Moringa oleifera* L) ASAL KOTA PALU SULAWESI TENGAH TERHADAP HISTOPATOLOGI PANKREAS TIKUS PUTIH JANTAN (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN

Submitted : 24 September 2019

Edited : 15 Juni 2020

Accepted : 25 Juni 2020

Viani Anggi, Joni Tandi, Veronika

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Pelita Mas Palu

Email : viani.anggi@gmail.com

ABSTRACT

This study aims to determine the content of flavonoid and the effect of ethanol extract of moringa seeds on the regeneration of pancreatic β cells in male white rats streptozotocin induced diabetes. This study method used has total flavonoid equivalent quercetin by spectrophotometry uv-vis and to regeneration of pancreatic β cells in male white rats used 30 test animals, namely male white rats divided into 6 groups, each group consisted of 5 male white rats with details of group I as normal control, Group II as negative control given 0.5% Na-CMC suspension, Group III as positive control given glibenclamide suspension and in Groups IV, V, and VI were given with each dose of 100 mg/kg BW, 200 mg/kg BW and 400 mg/kg BB. Histopathological damage picture of the pancreas was observed by staining HE using a 400x magnification olympus Cx21 microscope. The results showed that the ethanol extract of moringa seeds contained secondary metabolites, namely flavonoids, alkaloids, saponins and tannins. The results showed has total flavonoid equivalent quercetin of moringa seeds is 1,26% and regeneration of pancreatic β cells in male white rats streptozotocin induced diabetes of Moringa seed ethanol extract at a dose of 400 mg/kg BB can have an effect on the regeneration of β cells in the pancreas of white diabetic male rats.

Keywords : Total of flavonoid, moringa seeds, diabetes, histopathology, pancreas

PENDAHULUAN

Dari data hasil riset didapatkan bahwa Provinsi Sulawesi Tengah memiliki prevalensi untuk Diabetes yang terdiagnosis dengan gejala tertinggi sekitar 3,7%⁽¹⁾. Diabetes Melitus dapat ditandai oleh tingginya kadar glukosa didalam darah sebagai akibat adanya gangguan fungsi insulin atau penurunan sekresi insulin oleh sel β -pankreas. Pankreas adalah suatu organ didalam tubuh yang tersusun atas eksokrin dan endokrin. Kelenjar endokrin pankreas disusun atas pulau langerhans yaitu *cluster*

di sepanjang kelenjar eksokrin. Unit endokrin disebut pulau langerhans dengan empat macam sel, yaitu sel alfa, sel beta, sel delta dan sel F (polipeptida pankreas). Pada Sel beta menghasilkan insulin yang berfungsi untuk menurunkan glukosa darah. Perubahan dapat terjadi di histopatologi pulau langerhans, seperti ukuran dan jumlah, maupun secara kualitatif, dengan terjadinya nekrosis (kematian sel), Atrofi (pengcilan sel) dan fibrinosis (jaringan-jaringan sel yang rusak). Sel-sel yang rusak akibat bahan kimia dapat menyebabkan inflamasi

(peradangan). Kerusakan sel beta pankreas dapat disebabkan oleh faktor genetik, infeksi oleh kuman dan radikal bebas⁽²⁾.

Penelitian ini menggunakan tanaman Kelor (*Moringa oleifera* L) dengan mengambil biji sebagai bahan penelitian. Kelor adalah jenis sayuran yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat kota Palu sebagai menu sayuran favorit. Kelor dikenal sebagai pohon ajaib karena terbukti secara ilmiah merupakan sumber gizi berkhasiat yang kandungannya di luar kebiasaan kandungan tanaman pada umumnya. Kelor diketahui mengandung lebih dari 40 antioksidan dan 90 jenis nutrisi berupa vitamin, mineral dan asam amino^(3,4,5).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui total kandungan flavonoid ekstrak biji kelor dengan menggunakan spektrofotometri uv-vis dan melihat efektivitas regenerasi sel β -pankreas dengan mengamati gambaran histopatologi pankreas pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin dengan dosis 40 mg/Kg BB secara intraperitoneal (i.p). Ekstrak etanol biji kelor asal kota Palu Sulawesi Tengah dibuat variasi dosis yaitu 100, 200 dan 400 mg/Kg BB. Selanjutnya hasil pengamatan skoring tingkat kerusakan pankreas dianalisis secara statistik menggunakan uji non parametrik Kruskal-Wallis untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok dan kelompok kontrol, dimana jika terdapat perbedaan, akan dilanjutkan menggunakan uji Mann Whitney untuk melihat perbedaan yang bermakna dari setiap kelompok.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat gelas, ayakan 40 mesh, batang pengaduk, bejana maserasi, blender, cawan porselin, gelas kimia, gelas ukur, glukometer, glukotest strip test, kandang hewan uji, mikroskop, pipet tetes, pisau bedah, *Rotary Vacuum Evaporator*, spuit

injeksi, spuit oral, tabung reaksi, timbangan analitik, Timbangan gram, *Waterbath*.

Bahan

Air suling, Asam klorida, Besi (III) klorida, *Citrate-buffered saline*, biji kelor, Dragendorf LP, Etanol 96%, eter, formalin 10%, glibenklamid, Liebermann-Burchard, Serbuk Magnesium, Na CMC 0,5%, Natrium hidroksida, Natrium klorida, pewarnaan Hematoxylin Eosin, Streptozotocin, Parafin cair, Aseton, Alkohol.

Pembuatan Ekstrak Etanol biji kelor (*Moringa oleifera* L)

Pembuatan ekstrak biji kelor dilakukan dengan metode maserasi, yaitu ditimbang 2000 gram lalu diekstraksi selama 3 hari dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 8 liter. Kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat Ekstrak etanol biji kelor Selanjutnya dievaporasi atau memisahkan larutan menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* pada suhu 60°C dan dilanjutkan dengan penguapan yang dilakukan dengan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 75 gram.

Analisis Total Kandungan Flavonoid

Melakukan pembuatan kurva standar dengan menimbang quercetin sebanyak 10 mg dan menambahkan 0,3 ml natrium nitrit 5%, kemudian setelah 5 menit menambahkan 0,6 ml aluminium chloride 10% tunggu sampai 5 menit, menambahkan 2 ml natrium hidroksida 1 M dan tambahkan aquades sampai 10 ml dengan menggunakan labu takar dan pindahkan ke dalam kuvet dan tetapkan serapan pada panjang gelombang 510 nm.

Untuk Penetapan uji total flavonoid ekstrak biji kelor dengan menimbang 100 mg sampel ekstrak biji kelor dan masukkan

kedalam tabung reaksi 10 ml. Menambahkan 0,3 ml natrium nitrit 5%, kemudian setelah 5 menit menambahkan 0,6 ml aluminium chloride 10% dan tunggu sampai 5 menit, setelah itu menambahkan 2 ml natrium hidroksida 1 M dan adukkan dengan aquades hingga 25 ml dengan labu takar. Kemudian mengencerkan sesuai kebutuhan dan memindahkan ke dalam kuvet dan mengukur serapan pada panjang gelombang 510 nm.

Pembuatan Larutan Koloidal Na CMC 0,5%

Natrium karboksimetil selulosa (Na CMC) ditimbang sebanyak 0,5 gram dimasukan kedalam lumpang yang berisi 10 ml aquades yang telah dipanaskan, didiamkan selama 15 menit hingga diperoleh massa yang transparan, lalu dicampurkan sampai homogen. Larutan Na-CMC dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml. Volumennya kemudian cukupkan dengan aquades hingga 100 ml.

Pembuatan Larutan Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin ditimbang sebanyak 0,32 gram lalu dilarutkan menggunakan *citrate-buffer saline* dengan pH 4,5 sampai 100 ml, lalu diinduksikan pada tikus melalui intraperitoneal (ip). Dosis streptozotocin yaitu 40 mg/kg BB.

Pengujian Histopatologi pankreas

Pemeriksaan histopatologi pankreas dilakukan pada hari ke-28, dimana hewan uji dikorbankan dan dilakukan proses pembedahan untuk pengambilan organ pankreas, kemudian organ pankreas dipotong dan dimasukkan kedalam wadah yang berisi formalin 10%, kemudian dilakukan pembuatan sediaan preparat histologi pankreas dengan proses fiksasi menggunakan larutan formalin 10% selama 3-4 jam, selanjutnya dilakukan pengeringan menggunakan aseton sebanyak 3 kali selama 2 jam, kemudian

dilakukan pembersihan menggunakan toluen sebanyak 3 kali selama 1-2 jam, selanjutnya dilakukan proses embedding menggunakan parafin cair pada suhu 60°C sebanyak 3 kali selama 2 jam kemudian dilakukan proses pencetakan dan selanjutnya dilakukan pewarnaan dan kemudian diamati menggunakan mikroskop.

Analisis Data

Data hasil pemeriksaan mikroskopis yang diperoleh data skoring tingkat kerusakan pankreas tikus putih jantan. Selanjutnya dianalisis menggunakan uji non parametrik *Kruskall Wallis* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p < 0,05$ dipilih sebagai tingkat signifikansinya. Jika terdapat perbedaan yang signifikan maka dilakukan uji *Mann whitney* untuk melihat perbedaan yang bermakna setiap kelompok. Pengolahan data dilakukan menggunakan program software SPSS 23. Adapun hasil penurunan kadar glukosa darah digunakan sebagai nilai rujukan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Biji Kelor

No.	Pengujian	Hasil
1	Flavonoid	+
2	Saponin	+
3	Alkaloid	+
5	Tanin	+

Hasil Uji Total Flavonoid equivalent quercetin

Parameter Uji	Hasil Satuan	Metode
Total		
Flavonoid equivalent quercetin	1,26% b/b	Spektrofotometri Uv-Vis

Hasil Skoring tingkat kerusakan Pankreas Tikus Putih Jantan

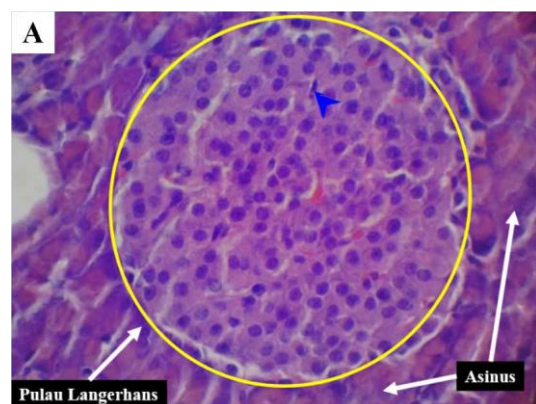
Perlakuan	Skoring Histopatologi					Rerata±SD
	1	2	3	4	5	
Kontrol normal	0.33	0	0	0	0	0.666±0.149
Kontrol negatif (Na CMC 0,5%)	1.67	1.67	0	2.67	2.5	0.79±1.056
Kontrol positif (Suspensi glibenclamide 0,45 mg/Kg BB)	0.4	1.33	0.6	0.8	1.67	0.76±0.351
Ekstrak Etanol Biji Kelor Dosis 100 mg/Kg BB	0.8	1	0.75	1.5	0.6	1.143±0.416
Ekstrak Etanol Biji Kelor Dosis 200 mg/Kg BB	1.2	0.8	1.25	1	0.6	0.97±0.272
Ekstrak Etanol Biji Kelor Dosis 400 mg/Kg BB	0.4	1	1	1.2	1	0.92±0.303

Hasil Uji lanjut Mann whitney

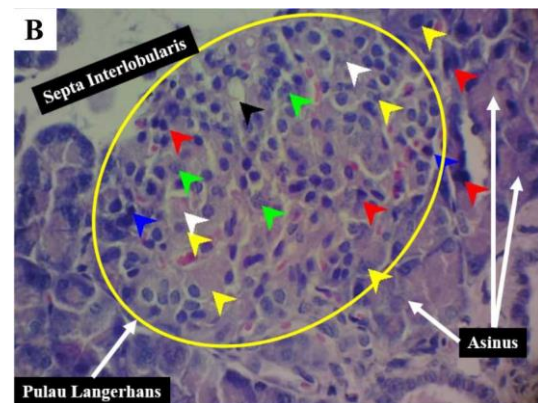
Kelompok Uji	k.normal	K.negatif	K.positif	Dosis 100	Dosis 200	Dosis 400
K.normal	-	0.034*	0.007*	0.007*	0.007*	0.006*
k.negatif	0.034*	-	0.116	0.169	0.116	0.112
k.positif	0.007*	0.116	-	0.94	0.344	0.396
Dosis 100 mg/Kg BB	0.007*	0.169	0.94	-	0.599	0.666
Dosis 200 mg/Kg BB	0.007*	0.116	0.344	0.599	-	0.746
Dosis 400 mg/Kg BB	0.006*	0.112	0.396	0.666	0.746	-

Gambaran histopatologi pankreas tikus putih jantan

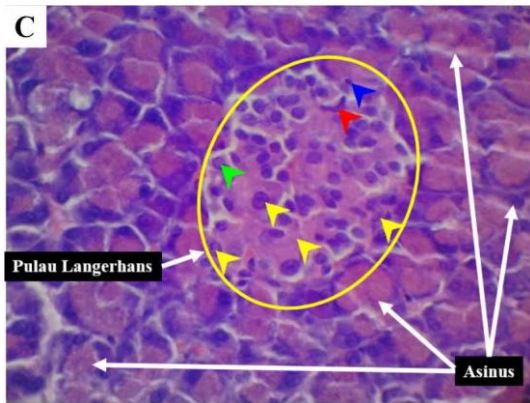
Preparat jaringan pankreas tikus putih, pewarnaan HE Pembesaran 400x.



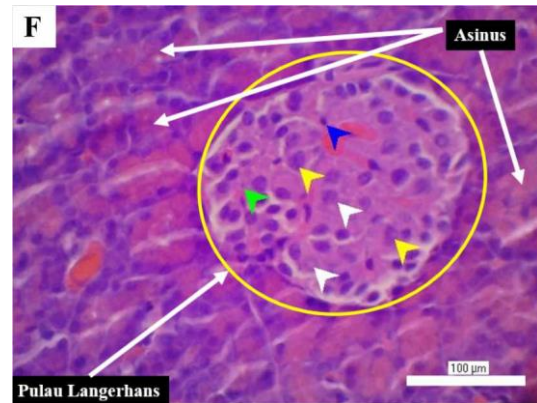
Kontrol normal Ket : sel mengalami piknosis



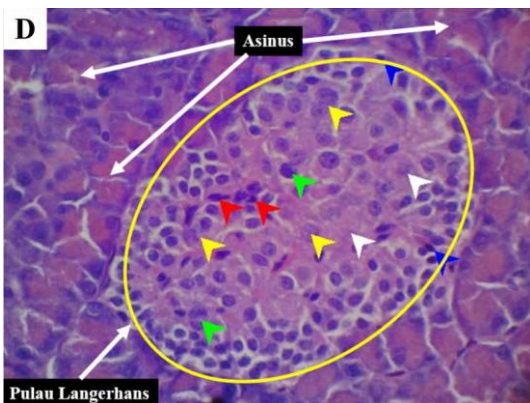
Kontrol negatif:sel mengalami piknosis (biru),degenerasi (kuning), nekrosis (hijau), kerioreksi (putih), edema (hitam) dan radang (merah)



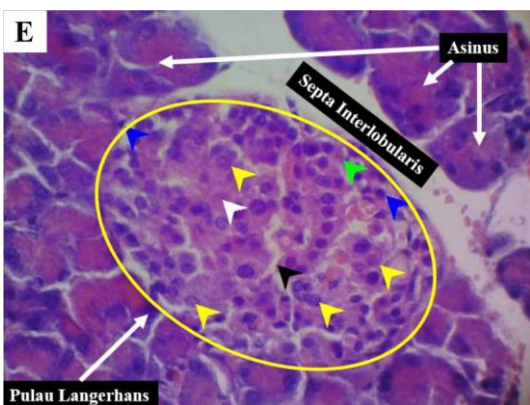
Kontrol positif : sel mengalami piknosis (biru), degenerasi (kuning), nekrosis (hijau), dan radang (merah)



Dosis 400 mg/kg BB : sel mengalami piknosis (biru), degenerasi (kuning), nekrosis (hijau) dan kerioreksi (putih)



Dosis 100 mg/kg BB : sel mengalami piknosis (biru), degenerasi (kuning), nekrosis (hijau), radang (merah) dan kerioreksi (putih)



Dosis 200 mg/kg BB : sel mengalami piknosis (biru), degenerasi (kuning), nekrosis (hijau), edema (hitam) dan kerioreksi (putih)

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan biji kelor (*Moringa oleifera* L) yang diperoleh dari Kec Palu Selatan, Kota Palu Sulawesi Tengah. Sebelumnya dilakukan identifikasi tanaman di UPT. Sumber Daya Hayati Universitas Tadulako Sulawesi. Hasil identifikasi membuktikan bahwa biji kelor yang digunakan dalam penelitian benar adalah spesies (*Moringa oleifera* L) Ekstrak kental biji kelor diperoleh dari proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi Selanjutnya dilakukan uji fitokimia dengan tujuan untuk mengidentifikasi kandungan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak biji kelor. Berdasarkan hasil dari uji penapisan fitokimia ekstrak biji kelor (*Moringa Oleifera* L) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin. Hal ini sesuai literatur yang diperoleh bahwa biji kelor (*moringa oleifera* L) memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin⁽⁶⁾. Dari hasil uji total flavonoid ekstrak biji kelor asal kota Palu Sulawesi Tengah dengan menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis diperoleh hasil total flavonoid sebesar 1,26% b/b.

Pada pengujian efek ekstrak etanol biji kelor terhadap perbaikan kerusakan

dengan melihat gambaran histologi pankreas tikus diabetes. Hewan uji dilakukan dengan cara diinduksi dengan streptozotocin 40 mg/kg BB yang diinjeksikan secara intraperitoneal yang bertujuan untuk meningkatkan kadar glukosa darah, streptozotocin dapat menginduksi terjadinya diabetes di mana STZ menembus sel β langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasilkan perubahan DNA sel β pankreas⁽⁷⁾. Setelah diberi perlakuan pada masing-masing kelompok tikus kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke 28 untuk diambil organ pankreasnya untuk dibuat preparat histologi pankreas. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Balai Besar Veteriner Maros dengan menggunakan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) kemudian dilanjutkan pengamatan dengan menggunakan mikroskop Pembesaran 400x.

Penelitian ini menganalisis hasil pemeriksaan histopatologis pankreas model tikus diabetes dengan terapi ekstrak etanol biji kelor menggunakan pewarnaan HE. Hasil pemeriksaan yang didapatkan pada pankreas secara umum menunjukkan struktur pulau-pulau Langerhans sebagai kelenjar endokrin, pada pewarnaan HE terpusat lebih pucat dibandingkan dengan sel-sel asinar sebagai kelenjar eksokrin. Sitoplasma sel-sel asinar maupun sel-sel pada pulau Langerhans tampak merah muda sedangkan inti sel tampak ungu. Pada kelompok kontrol normal struktur pulau-pulau Langerhans tampak normal yang ditandai dengan bentuk sel yang cenderung bulat, sitoplasma terpusat merah muda dan nukleus terpusat ungu, sel-sel tersebut tersusun padat dan berbatas jelas. Pada satu lapangan pandang ditemukan adanya sel piknotik, akan tetapi jumlahnya sangat sedikit, seperti yang terlihat pada gambar A. Yang merupakan kelompok kontrol negatif atau mengalami diabetes yang tidak

terkontrol; menunjukkan jumlah pulau-pulau Langerhans lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol normal. Ukuran pulau-pulau Langerhans lebih kecil dengan jumlah sel yang kurang dari dua puluh dan tidak tersusun padat dengan bentuk pulau Langerhans yang cenderung poligonal dan tidak membulat. Sel-sel pada struktur pulau Langerhans juga tampak mengalami mengalami degenerasi dan nekrosis serta adanya sel-sel piknosis (inti sel memadat dan terpusat sangat gelap) maupun karioreksis (sel menghilang atau mengalami fragmentasi). adanya sel radang cukup banyak dijumpai baik di dalam struktur pulau Langerhans maupun di sekitar sel-sel asinar. Beberapa lapangan pandang memperlihatkan adanya edema yang ditandai dengan adanya rongga-rongga kosong pada struktur pulau Langerhans. Pada kelompok kontrol positif, struktur pulau Langerhans menunjukkan gambaran yang berbeda dengan kelompok kontrol negatif dan tampak seperti kelompok kontrol normal. Sel-sel tersusun padat, sekalipun ditemukan sel-sel yang mengalami degenerasi, nekrosis dan piknosis. Sel-sel radang juga ditemukan pada kelompok ini, serta gambaran edema pada beberapa lapangan pandang. Kelompok ekstrak biji kelor dosis 100 menunjukkan banyak sel-sel yang mengalami degenerasi, dan sebagian nekrosis, piknosis, karioreksis dan adanya sel-sel radang yang cukup banyak. Bentuk sel tampak tidak beraturan dengan batas antar sel yang tidak jelas serta tersusun jarang. Pada kelompok ini kerusakan pulau Langerhans lebih parah bila dibandingkan kelompok kontrol positif yang diberikan suspensi glibenklamid. Kelompok ekstrak etanol biji kelor dosis 200, menunjukkan gambaran struktur yang sedikit lebih baik bila dibandingkan dengan kelompok ekstrak etanol biji kelor dosis 100 tapi tidak seperti kelompok kontrol positif. Bentuk

sel-sel masih banyak yang nekrosis, piknosis maupun karioreksis serta struktur pulau Langerhans yang mengalami edema maupun sel radang. Struktur pulau Langerhans pada kelompok ekstrak etanol biji kelor dosis 400 menunjukkan hasil yang berbeda dengan kelompok ekstrak etanol biji kelor dosis 200, sel-sel normal banyak ditemukan, namun masih ada sel-sel yang mengalami degenerasi, nekrosis, sel-sel piknosis maupun karioreksis. Secara umum struktur pulau Langerhans pada kelompok ini tidak berbeda dengan kelompok ekstrak etanol biji kelor dosis 200.

Gambaran histopatologi pankreas tikus yang telah diamati dan diberikan skoring kemudian dianalisis dengan menggunakan analisis *non-parametrik kruskal-wallis*. Uji ini dilakukan untuk melihat adanya perbedaan signifikan dari semua kelompok perlakuan. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan melihat nilai signifikansi $P < 0,05 = 0,012$ yang artinya terdapat perbedaan dari tiap kelompok perlakuan selanjutnya dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan tiap perlakuan. Pengujian *Mann-Whitney* kelompok normal berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$) = 0,034, positif = 0,007, dosis 100 = 0,007, dosis 200 = 0,007, dosis 400 = 0,006. Pengujian *Mann-Whitney* kelompok negatif berbeda signifikan terhadap kelompok positif = 0,116, dosis 100 0,169, dosis 200 0,116, dosis 400 = 0,112. Pengujian *Mann-Whitney* kelompok positif berbeda signifikan terhadap dosis 100 = 0,094, dosis 200 = 0,334, dosis 400 = 0,396. Pengujian *Mann-Whitney* kelompok ekstrak biji kelor dosis 100 mg/kg BB berbeda signifikan terhadap dosis 200 = 0,599, dan dosis 400 = 0,666. Pengujian *Mann-Whitney* kelompok ekstrak biji kelor dosis 200 berbeda signifikan terhadap kelompok ekstrak biji kelor dosis 400 = 0,746.

Berdasarkan hasil dari preparat histopatologi pankreas dan statistik yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa pada dosis 100 banyaknya sel yang mengalami degenerasi, sebagian nekrosis, piknosis, karioreksi dan adanya sel-sel radang yang cukup banyak. Hal ini kemungkinan terjadi karena gangguan sistem metabolisme kandungan zat aktif yang tidak terlarut sempurna di dalam tubuh tikus sehingga tidak terserap maksimal di dalam reseptor^(8,9). Pada dosis 200 sedikit lebih baik bila dibandingkan dengan dosis 100, namun masih banyak sel-sel yang nekrosis, piknosis, karioreksi, edema dan sel-sel radang. Pada dosis 400 menunjukkan hasil yang berbeda dibandingkan dengan dosis 200, sel-sel normal banyak ditemukan, namun ada beberapa sel yang mengalami degenerasi, nekrosis, piknosis dan karioreksi. Hal ini terjadi karena zat aktif yang terkandung diserap sempurna di dalam reseptor.

Salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol biji kelor yaitu flavonoid dengan total kandungan 1,26% b/b,. Flavonoid berperan terhadap mekanisme molekuler yang melibatkan reaksi stress oksidatif glycation non enzymatic dan polyol pathway⁽¹⁰⁾. Senyawa flavonoid berperan sebagai antioksidan yang mampu mengikat radikal bebas sehingga dapat mengurangi stress oksidatif⁽¹¹⁾. Berkurangnya stress oksidatif dapat mengurangi resistensi insulin dan mencegah perkembangan disfungsi dan kerusakan sel β pankreas.

SIMPULAN

Senyawa metabolit sekunder terdapat pada ekstrak etanol biji kelor (*moringa oleifera* L) yaitu flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin. Total Flavonoid ekstrak biji kelor dengan metode spektrofotometri Uv-Vis sebesar 1,26% b/b. Pemberian ekstrak etanol ekstrak etanol biji kelor (*moringa*

oleifera L) mempunyai pengaruh terhadap regenerasi sel β pankreas tikus putih jantan yang diinduksi streptozotocin, dengan dosis 400 mg/Kg BB dapat memberikan efek yang lebih baik terhadap regenerasi sel β pankreas dibanding dosis 100 dan dosis 200 mg/Kg BB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes RI. 2018. *Riset kesehatan Dasar; RISKESDAS*. Jakarta : Balitbang Kemenkes Republik Indonesia. 57.
2. William P. Glasheen, Andrew Renda, Yanting Dong. 2017. *Diabetes Complication Severity Index (DCSI)-Update and ICD-10 Translation*. Journal of Diabetes Complications 31:1007-1013.
3. Robertino Ikalinus, Sri Kayati Widyastuti, Niluh Eka Setiasih. 2015. *Phytochemical screening ethanol extract ekim stem Moringa Oleifera*. Indonesia Medicus Veterinus Journal, 4(1): 71-79.
4. Milan Stefek. 2011. *Natural Flavonoids as Potential multifunctional agents in Prevention Of Diabetic*. Interdiscip Toxicology, 4(2) :69-77.
5. Meraiyebu Ajibola, Ogunwole Eunice, Izuchukwu Nnnedinma Stephanie. 2014. *Effects of Moringa Oleifera Seeds on Aloxan Induced Hyperglycemia*. Basic Sciences of Medicine, 3(3):37-42.
6. Abdulrahman, Al-Malki, Haddad A. El Rabey. 2015. *The Antidiabetic Effect of Low Doses of Moringa Oleifera Lam. Seeds on streptozotocin Induced Diabetes and Diabetic Nephropathy in Made Rats*. Biomed Research International,1-13.
7. Shailaja G.Mahajan, Rawindra E.Mali, Anita A.Mehta. 2007. *Protective Effect of ethanolic extract of seed of Moringa Oleifera Lam.Against Inflammation Associated with Development of Arthritis in Rats*. Journal of Immunotoxicology, 4:39-47.
8. Nijveldt, R.J, Nood, E.V, Hoorn, D.E, Beelens, P.G, Noreni, K.V, Paul, A.M, Leeuwen, V. 2001. *Flavonoids: A Review of Probable mechanism of action and Potential Applications*. Am.J.Clin Nutrition, 74:418-425.
9. M.R. Khumbare, V.Guicha, T.Sivakumar. 2012. *Estimation of Total Phenolic Content, Cytotoxicity and In Vitro Antioxidant activity of stem bark of Moringa Oleifera*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2(2): 219-223.
10. F. Anwar, S.Latif, M. Ashraf, A.H. Gilani. 2007. *Moringa Oleifera : A Food Plant with multiple Medicinal Uses*. Phytoteraphy Research, 21(1):17-25.
11. Urios P, Grigorova Borsos, Sternberg. 2007. *Flavonoids Inhibits to the Formation of the cross linking Age Pentosidine in Collagen Incubated with Glucose According to their Structure*. Eur J.Nutrition, 46: 139-146