

SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW : POMEGRANATE IMPROVES NITRIC OXIDE LEVEL IN OXIDATIVE STRESS

Siti Norazizah¹, Nugroho Wibisono¹, Doti Wahyuningsih^{1*}

¹Faculty of Medicine University Of Islam Malang

Abstract : *Nitric Oxide* (NO) is a free radical. *Nitric Oxide* (NO) level increase in every oxidative stress condition. Pomegranate extract is reported to repair the NO level from oxidative stress condition by its antioxidant compounds, mainly polyphenol. The study used systematic literature review aims to find out the effect of pomegranate (*Punica granatum*) to *Nitric Oxide* (NO) level on serum, plasma, hepar, brain, limfe, intestine, renal and endotel tissue that obtained from the disease which its pathophysiology involves oxidative stress (injury, toxicity, inflammation, and infection). The pomegranates parts studied here are fruit, peel, seed, and flower. Systematic literature review. The data collection is obtained from PubMed and Google Scholar by the *Punica granatum*, *Antioxidant*, and *Nitric Oxide* as the keywords. From the screening process, data collected was 14 articles were qualified by inclusion criteria. Antioxidant compounds found in pomegranate fruit, peel, flower, and seed extracts are proven to improve NO level by reducing NO levels in the serum, plasma, liver, brain, intestine, lymph, renal and increasing NO in endothelial tissue under conditions of oxidative stress. By the 14 journals reviewed, the main anti-oxidant mechanism of pomegranate extract to repair NO level was occurred by increasing the antioxidant and free radical clearance. The application of fruit, peel, flower and seed extract of pomegranate (*Punica granatum*) could give antioxidant effect by repairing NO level in oxidative stress condition.

Keyword: *Punica granatum*, *Antioxidant*, *Nitric Oxide*.

STUDI PUSTAKA SISTEMATIS: DELIMA MEMPERBAIKI KADAR *NITRIC OXIDE* PADA BERBAGAI KONDISI STRES OKSIDATIF

Siti Norazizah¹, Nugroho Wibisono¹, Doti Wahyuningsih^{1*}

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Universitas Islam Malang

*dotiwahyuningsih@unisma.ac.id

Abstrak : *Nitric Oxide* (NO) merupakan suatu radikal bebas. Peningkatan kadar NO didapatkan pada berbagai kondisi stres oksidatif. Pemberian ekstrak delima dilaporkan dapat memperbaiki kadar NO dalam kondisi stres oksidatif karena adanya kandungan antioksidan pada delima terutama senyawa polifenol. Penelitian menggunakan metode studi pustaka sistematis bertujuan mengetahui pengaruh delima (*Punica granatum*) terhadap kadar *Nitric Oxide* (NO) pada serum, plasma, jaringan hepar, otak, limfe, usus, ginjal dan endotel yang diperoleh dari penyakit yang patofisiologinya melibatkan stres oksidatif (*injury*, toksisitas, inflamasi dan infeksi). Bagian delima yang dipelajari pada penelitian ini adalah buah, kulit, biji dan bunga. Studi pustaka sistematis. Pengumpulan data penelitian dilakukan melalui sumber *PubMed*, dan *Google Scholar* dengan kata kunci *Punica granatum*, *Antioxidant*, dan *Nitric Oxide*. Melalui proses *screening* didapatkan data berupa 14 artikel memenuhi kriteria inklusi yang telah ditetapkan. Senyawa antioksidan yang terdapat dalam ekstrak buah, kulit, bunga, dan biji delima terbukti mampu memperbaiki nilai NO dengan menurunkan kadar NO pada jaringan hepar, otak, usus, limfe, ginjal dan meningkatkan NO pada jaringan endotel pada kondisi stres oksidatif. Melalui 14 jurnal yang ditelaah, mekanisme antioksidan utama ekstrak delima dalam memperbaiki nilai NO adalah melalui peningkatan antioksidan dan pembersihan radikal bebas. Pemberian ekstrak buah, biji, kulit, dan bunga delima (*Punica granatum*) dapat memperbaiki kadar radikal NO pada kondisi stres oksidatif.

Kata Kunci : *Punica granatum*, *Antioxidant*, *Nitric Oxide*

PENDAHULUAN

Stres oksidatif merupakan suatu kondisi dimana terjadinya ketidakseimbangan antara pertahanan antioksidan dan ROS yakni terjadinya peningkatan ROS secara berlebihan (Preiser, 2012). Kondisi stres oksidatif yang bersifat patologi dalam tubuh akan menimbulkan beberapa penyakit dari yang akut hingga kronik. Peningkatan stres oksidatif ditemukan dalam kasus konsumsi alkohol yang kronis, obesitas, merokok, dan paparan kronis terhadap polutan udara. Penemuan tingkat stres oksidatif yang lebih tinggi terjadi pada kondisi diabetes atau stres hiperglikemia, penyakit paru obstruktif kronik, peradangan kronis dan akut, kanker, dan reperfusi iskemia dimana semakin mendukung hipotesis peran patogenetik stres oksidatif. Demikian pula, temuan epidemiologi menunjukkan hubungan antara menipisnya simpanan antioksidan dengan peningkatan prevalensi berbagai kelainan, termasuk kanker, penyakit jantung, penuaan yang dipercepat, dan penyakit neurodegenerative (Bjelakovic dkk, 2007).

Nitric Oxide (NO) merupakan salah satu indikator yang biasanya digunakan dalam menilai kondisi stres oksidatif. Secara fisiologis, NO memiliki peranan penting dalam tubuh seperti sistem imun, sistem saraf dan proses inflamasi serta berperan sebagai vasodilator pembuluh darah (Omer dkk., 2012). Namun, NO dapat membentuk molekul teroksidasi dengan salah satu jenis ROS yakni *Superoxide anion* (O_2^-) menjadi *Peroxynitrite* ($ONOO^-$). Molekul teroksidasi ini dapat menyebabkan kerusakan DNA, perubahan transkripsi gen, dan perubahan pembentukan protein (Leonodou dkk., 2018).

Kondisi stres oksidatif dapat diatasi dengan antioksidan. Antioksidan merupakan zat yang dalam konsentrasi rendah dapat menunda ataupun mencegah terjadinya keadaan stres oksidatif (Francenia dkk., 2019). Suplemen antioksidan telah banyak digunakan dan dianggap dapat mencegah beberapa penyakit. Namun, berdasarkan jurnal yang ditulis oleh Bjelakovic dkk., (2015) disebutkan bahwa antioksidan dalam bentuk suplemen dengan dosis yang tidak tepat akan menyebabkan kerusakan dalam tubuh. Dengan demikian, diperlukan bahan yang lebih aman dan bermanfaat yang dapat digunakan sebagai antioksidan, misalnya tanaman herbal.

Sehubungan dengan itu buah delima (*Punica granatum*) dilaporkan memiliki kandungan antioksidan yang tinggi (senyawa bioaktif seperti flavonoid dan antosianin) yang biasanya digunakan sebagai pengobatan tradisional untuk pasien dengan stres oksidatif dan inflamasi (Rasheed, 2016). Selain memiliki manfaat yang banyak, delima (*punica granatum*) sudah tersebar hampir di seluruh dunia sehingga mudah untuk di dapat (Wijayanto, 2016). Pada penelitian sebelumnya, dinyatakan bahwa konsumsi buah delima dan ekstrak kulit buah delima yang kaya akan antioksidan akan menurunkan tingkat stres oksidatif dengan menurunkan ekspresi dari salah satu enzim penghasil radikal bebas yakni NOS (Spilmont *et al*, 2015).

Berdasarkan laporan tersebut, peneliti ingin mengetahui apakah benar aktivitas antioksidan dari delima (*Punica granatum*) dapat memperbaiki kadar NO sebagai radikal bebas di berbagai kondisi stres oksidatif pada studi *in vivo* melalui telaah beberapa jurnal sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi

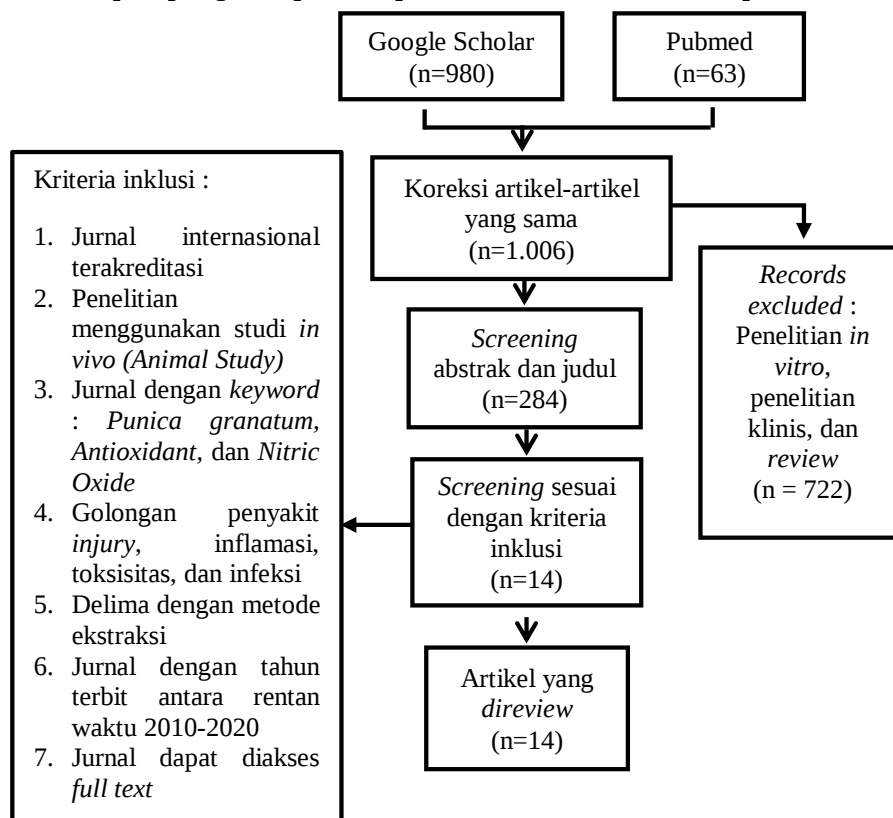
METODE

Pencarian Data. Pencarian data dilakukan menggunakan situs penyedia jurnal internasional seperti Google Scholar dan Pubmed sesuai dengan kata kunci *Punica granatum*, *Antioxidant*, *Nitric Oxide* sehingga mampu mewakili *research problem* yang ingin di teliti yaitu pengaruh delima (*Punica granatum*) terhadap kadar *Nitric Oxide* (NO) pada berbagai kondisi stres oksidatif. Pencarian keyword disertai dengan penggunaan sinonim dan *Medical Subject Headings* (MeSH) sebagai berikut: *Punica granatum* AND *Antioxidant* AND *Nitric Oxide*

Kriteria Inklusi dan Eksklusi. Kriteria inklusi pada penelitian ini berupa: (1) Jurnal internasional terakreditasi. (2) Penelitian menggunakan studi *in vivo*. (3) Jurnal dengan keyword: *Punica granatum*, *Antioxidant*, dan *Nitric Oxide* (4) Golongan penyakit *injury*, inflamasi, toksisitas dan infeksi. (5) Delima dengan metode ekstraksi. (6) Jurnal dengan tahun terbit antara rentan waktu 2010-2020. (7) Jurnal dapat diakses *full text*.

Kriteria eksklusi yang ditetapkan peneliti berupa: (1) Bukan merupakan jurnal internasional terakreditasi. (2) Penelitian tidak menggunakan studi *in vivo*. (3) Jurnal tidak mengandung keyword: *Punica granatum*, *Antioxidant*, dan *Nitric Oxide*. (4) Tidak termasuk golongan penyakit *injury*, inflamasi, toksisitas dan infeksi (5) Delima dengan metode jus. (6) Jurnal dengan tahun terbit dibawah 2010. (7) Jurnal tidak dapat diakses *full text*.

Ekstraksi Data. Ekstraksi data dilakukan setelah proses screening dan penilaian kualitas data dilakukan dan didapatkan data sesuai dengan syarat yang telah ditentukan. Penilaian kualitas data dilakukan menggunakan website “schimago” untuk menilai validitas jurnal tersebut. Data artikel hasil penelitian yang data yang diekstraksi meliputi referensi, jenis studi, hipotesa, variable, jumlah sampel, pengelompokkan penelitian dan efek terhadap kadar NO.



Gambar 1. Diagram Alur Penelitian

HASIL

Efek Ekstrak Delima terhadap Kadar NO pada Tikus Model Stres Oksidatif yang diinduksi oleh *Injury*

Pemberian ekstrak delima dapat berpotensi memperbaiki kondisi stres oksidatif yang disebabkan oleh *injury* ditunjukkan dalam tabel 1. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ahmed dkk., (2014) disebutkan bahwa pemberian ekstrak buah delima dengan dosis 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB selama 15 hari dapat menurunkan kadar NO secara signifikan masing-masing sebesar 23% dan 27% dibandingkan dengan kelompok yang sudah diberikan induksi I/R. Penurunan NO juga ditunjukkan dalam hasil penelitian oleh Otunctemur dkk., (2015) yakni ekstrak buah delima dengan dosis 100 µ/L selama 14 hari dapat menyebabkan penurunan NO secara signifikan dengan $P < 0,05$ dibandingkan dengan UO *group* pada kondisi kerusakan ginjal. Hasil yang sama dilaporkan dalam penelitian Jain dkk., (2013) bahwa pemberian PFE dengan dosis 100 mg/kg dan 300 mg/kg pada model tikus yang diinduksi dengan TST dapat menurunkan kadar NO dari angka 44.04 ± 2.72 menjadi 37.62 ± 2.54 (PFE dosis 100 mg/kg) dan 33.15 ± 2.39 (PFE dosis 300 mg/kg).

Tabel 1 Efek Ekstrak Delima terhadap penurunan kadar NO pada kondisi *Injury*

Referensi	Jenis Studi	Hipotesa	Variabel	Jumlah Sampel	Pengelompokan penelitian	Efek terhadap Kadar NO
Ahmed dkk., 2014	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak delima Dependen Iskemi/reper fusi serebral dan intergritas DNA	40 Tikus Wistar Jantan	4 kelompok (n=10) - Kelompok 1 : kontrol - Kelompok 2 : induksi I/R - Kelompok 3 : PMG 250 mg/kg selama 15 hari + Induksi I/R - Kelompok 4 : PMG 500 mg/kg selama 15 hari + Induksi I/R	↓NO secara signifikan pada kelompok PMG250+I/R dan PMG500+I/R ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok I/R
Otunctemur dkk., 2015	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak delima Dependen Kerusakan Renal	32 Tikus Albino Wistar Jantan	4 Kelompok (n=8) - Kelompok 1 : kontrol - Kelompok 2 : operasi palsu - Kelompok 3 : induksi ligasi ureter - Kelompok 4 : induksi ligasi ureter + PE 100 µ/L) selama 14 hari	↓NO secara signifikan pada kelompok UO+PE ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok UO
Jain dkk., 2013	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak buah delima Dependen <i>Neuropathic pain</i>	Tikus Wistar	18 kelompok (n=6) - Kelompok 1 : kontrol - Kelompok 2 : Sham Control - Kelompok 3 : induksi TST - Kelompok 4 : TST+CMC 0,05 % - Kelompok 5 : PFE 300 mg/kg p.o 24 hari - Kelompok 6 dan 7 : PFE (100 mg dan 300 mg +TST	↓NO pada dosis 300 mg/kg dan 100 mg/kg dengan $P < 0,05$ dibandingkan kelompok TST

-
- Kelompok 8 : BADGE 120 mg/kg IP
 - Kelompok 9 dan 10 : BADGE+PFE+TST
 - Kelompok 11 : L-NAME 5 mg/kg IP+ TST
 - Kelompok 12 : L-arginine 100 mg/kg IP+ TST
 - Kelompok 13 dan 14 : L-NAME 5 mg/kg IP + PFE + TST
 - Kelompok 15 dan 16 : L-arginine 100 mg/kg IP+ PFE + TST
 - Kelompok 17 : Gabapentin 100 mg/kg
 - Kelompok 18 : Gabapentin +TST
-

Keterangan : ↓ : menurunkan; NO : *Nitric Oxide*; PMG : *pomegranate extract*; I/R : *cerebral ischemia/reperfusion*; p.o : per oral; PE : *Pomegranate Extract*; PFE : *Pomegranate Flower Extract*; UUO : *Unilateral Ureteral Obstruction*; TST : *Tibial and Sural Nerve Transection*.

Efek Ekstrak Delima terhadap Kadar NO pada Tikus Model Stres Oksidatif yang diinduksi oleh Toksisitas

Potensi ekstrak delima terhadap kadar NO pada kondisi stres oksidatif yang disebabkan oleh toksisitas dijelaskan dalam tabel 2. Hal tersebut dijelaskan dalam penelitian oleh Cekmen dkk., pada tahun (2013) dimana ekstrak buah delima dengan dosis 100 µ/L selama 14 hari dapat menyebabkan penurunan NO pada kondisi nefrotoksitas namun tidak signifikan. Sedangkan, ekstrak infusa biji dan kulit delima dapat menurunkan NO pada kondisi toksisitas dilaporkan dalam penelitian Ahmed dkk., (2016). Dalam penelitian tersebut, dinyatakan bahwa ekstrak biji delima, kulit delima dan campurannya dapat menurunkan NO secara signifikan secara berturut turut dengan $P < 0,01$ dan $P < 0,05$ dalam kondisi *cardiorenal toxicity*.

Penggunaan ekstrak methanol dalam menurunkan kadar NO dilaporkan pada penelitian Moneim dkk, (2013), Moneim dkk., (2016), dan El-Habibi El- Sayed, (2013). Pemberian ekstrak methanol dilakukan dalam beberapa perlakuan, antara lain ekstrak 100 ml methanol dalam penelitian El-Habibi El- Sayed, (2013) serta pemberian ekstrak methanol dengan perbandingan 1:2:2 (kulit/air/methanol) pada penelitian Moneim dkk pada tahun (2013) dan (2016). Moneim dkk., (2013) melaporkan bahwa penggunaan 200 mg/kgBB methanol ekstrak kulit buah delima dengan komposisi 1:2:2 (kulit/air/methanol) dapat menyebabkan penurunan secara signifikan dengan $P < 0,05$ terhadap kadar LPO dan NO serta peningkatan GSH dibandingkan dengan kelompok kontrol pada tikus dengan *hepatorenal toxicity* yang diinduksi $AlCl_3$. Hal serupa ditunjukkan pada penelitian Moneim dkk, (2016) yakni penggunaan ekstrak methanol kulit delima dengan dosis dan komposisi yang sama dapat menurunkan kadar LPO dan NO secara signifikan disertai peningkatan GSH dengan $p < 0,05$ pada homogenat jaringan otak yang mengalami stres oksidatif akibat induksi $AlCl_3$. Namun, hasil berbeda ditunjukkan dalam penelitian El-Habibi dan El-Sayed., (2013), dimana pemberian ekstrak methanol kulit delima dilaporkan menyebabkan peningkatan kadar NO secara signifikan dengan $P \leq 0,05$ pada tikus model *Chronic Renal Failure* akibat induksi *adenine*.

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Motamedi dkk., (2014), pemberian ekstrak hidroalkoholik bunga delima dengan dosis rendah dapat menyebabkan peningkatan signifikan kadar NO pada tikus model nefrotoksitas. Hasil berbeda ditunjukkan pada penelitian Sadeghi dkk., (2015), dimana pemberian PFE dapat menyebabkan penurunan kadar NO ginjal secara signifikan dengan $P < 0,05$ dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Tabel 2 Efek Ekstrak Delima terhadap penurunan kadar NO pada kondisi Toksisitas

Referensi	Jenis Studi	Hipotesa	Variabel	Jumlah Sampel	Pengelompokkan penelitian	Efek terhadap Kadar NO
Ahmed dkk., 2016	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Jus dan ekstrak delima Dependen Toksisitas Kardioresnal	60 Tikus Albino Jantan	6 Kelompok (n=10) - Kelompok 1 : kontrol diberikan air, saline, mineral oil - Kelompok 2 : Induksi DMBA50 mg/BB p.o dan CCl ₄ 3 ml/BB/minggu selama 13 minggu - Kelompok 3 : Induksi DMBA/CCl ₄ +PJ 10 ml/BB/hari 16 minggu - Kelompok 4 : Induksi DMBA/CCl ₄ +PSE 400 mg/BB/hari 16 minggu - Kelompok 5 : Induksi DMBA/CCl ₄ +PHE 400 mg/BB/hari 16 minggu - Kelompok 6 : Induksi DMBA/CCl ₄ + PME 10 ml/BB/hari 16 minggu	↓NO secara signifikan pada kelompok DMBA/CC L ₄ -PSE, dan DMBA/CC L ₄ -PHE (P<0,01;LS D) serta DMBA/CC L ₄ -PME (P<0,05;LS D) dibandingkan dengan kelompok DMBA/CC L ₄
Cekmen dkk., 2013	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak delima Dependen Nefrotoksisitas	32 Tikus Albino Wistar Jantan	4 Kelompok (n=8) - Kelompok 1 : kontrol - Kelompok 2 : induksi GEN 100 mg/gBB 14 hari - Kelompok 3 : GEN + distilled water nasogastric selama 14 hari Kelompok 4 : GEN + PE (100µ/L) selama 14 hari	↓NO secara signifikan pada kelompok GEN+PE (P<0,05) dibandingkan dengan GEN-treated group
El- Habibi dan El Sayed, 2013	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen <i>Punica granatum</i> Dependen Gagal jantung kronis	36 Tikus Albino Jantan	6 Kelompok (n=6) - Kelompok 1 : diet ad libitum 4 minggu - Kelompok 2 : normal diet+PJ gastric tube 3 ml/kgBB 4 minggu - Kelompok 3 (PPME) : normal diet + p.o PPME 200 mg/kgBB 4 minggu - Kelompok 4 (AD) normal diet+adenine (0,75% w/w) 4 minggu - Kelompok 5 :(AD+PJ): Normal diet+adenine+PJ - Kelompok 6 (AD+PPME) : Normal diet+AD+PPME	↑NO pada kelompok PPME (P≤0,05) dibandingkan kelompok AD

Referensi	Jenis Studi	Hipotesa	Variabel	Jumlah Sampel	Pengelompokkan penelitian	Efek terhadap Kadar NO
Motamedi dkk., 2014	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak bunga delima Dependen Nefrotoksisitas	32 Tikus Wistar Jantan	5 Kelompok (acak) - Kelompok 1 (n=6) : PFE (25mg/kg/hari) selama 9 hari+dari hari ke 3 diinduksi CP 2,5 mg/kg/hari - Kelompok 2 (n=6) : PFE (50mg/kg/hari) selama 9 hari+dari hari ke 3 diinduksi CP - Kelompok 3 (n=8) : positif kontrol = dari hari ke 3 diinduksi CP+ saline - Kelompok 4 (n=6) : negative control = PFE (25mg/kg/hari) selama 9 hari - Kelompok 5 (n=6) : negative control = PFE (50mg/kg/hari) selama 9 hari	↑NO pada kelompok CP + PFE (P<0,05) dibanding kan kelompok CP
Moneim dkk., 2013	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak kulit delima Dependen Toksisitas Hepatorenal	28 Tikus Wistar Albino Betina	4 Kelompok - Kelompok 1 : kontrol - Kelompok 2 : induksi AlCl ₃ 34mg/kgBB p.o melalui <i>gastric tube</i> - Kelompok 3: MEPP 200mg/kgBB p.o melalui <i>gastric tube</i> - kelompok 4 : MEPP 1 jam sebelum diberikan AlCl ₃	↓NO pada kelompok MEPP+ AlCl ₃ (P<0,05) dibanding kan dengan kelompok AlCl ₃
Sadeghi dkk., 2015	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak bunga delima Dependen Toksisitas renal	28 Tikus Wistar Jantan	5 kelompok - Kelompok 1 (n=6) PFE 25 mg/kgBB i.p selama 9 hari - Kelompok 2 (n=6) : PFE 50 mg/kgBB i.p selama 9 hari - Kelompok 3 (n=5) : saline i.p selama 9 hari dan pada hari ke 3 ditambahkan GM 100 mg/kg - Kelompok 4 (n=4) : PFE 25 mg/kgBB i.p selama 9 hari dan dari hari ke 3 diinduksi dengan GM - Kelompok 5 (n=7) : PFE 50 mg/kgBB i.p selama 9 hari dan dari hari ke 3 diinduksi dengan GM	↓NO secara signifikan pada kelompok PFE25+GM (P<0,05) dibanding kan dengan kelompok GM

Referensi	Jenis Studi	Hipotesa	Variabel	Jumlah Sampel	Pengelompokkan penelitian	Efek terhadap Kadar NO
Moneim dkk., 2016	In vivo	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak kulit delima Dependen stress oksidatif dan histopatologi otak	28 Tikus Albino Swiss Jantan	4 Kelompok (n=7) - Kelompok 1 : kontrol - Kelompok 2 : induksi Aluminum Chloride (AlCl ₃) 34mg/kgBB p.o - Kelompok 3 : induksi AlCl ₃ + PPME 200 mg/kgBB p.o - Kelompok 4 : PPME 200 mg/kgBB, lalu 1 jam kemudian di induksi oleh AlCl ₃	↓↓NO secara signifikan pada kelompok AlCl ₃ + PPME (P<0,05) dibandingkan dengan kelompok AlCl ₃

Keterangan : ↑ : meningkatkan; ↓ : menurunkan; NO : Nitric Oxide; PMG : pomegranate extract; I/R : cerebral ischemia/reperfusion; PSE : *P.granatum Seed Extract*; PHE : *P.granatum Husk Extract*; PME : *P. Granatum Mixture of extracts and juice*; DMBA : hydrocarbon 7,12- Dimethylbenz (A) Anthracene; CCl₄ : Carbon tetrachloride; p.o : per oral; GEN : Gentamicin; PE : Pomegranate Extract; i.p : intraperitoneal; AD : Adenine; PPME : Pomegranate Peel Methanol Extract; PPE : Pomegranate Peel Extract; PFE : Pomegranate Flower Extract; CP : Cisplatin; MEPP : Methanolic Extract of the Pomegranate Peel; AlCl₃ : Aluminium Chloride; GM : Gentamicin

Efek Ekstrak Delima terhadap Kadar NO pada Tikus Model Stres Oksidatif yang diinduksi oleh Inflamasi

Efek ekstrak delima terhadap kadar NO pada tikus model stres oksidatif yang diinduksi oleh inflamasi ditunjukkan dalam tabel 3. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Larossa dkk., (2010) disebutkan bahwa pemberian *Pomegranate Extract* (PE) dengan dosis 250 mg/kgBB/hari dapat menurunkan kadar NO melalui ekspresi iNOS secara signifikan dibandingkan dengan kelompok tikus yang diinduksi DSS

Tabel 3 Efek Ekstrak Delima terhadap penurunan kadar NO pada kondisi Inflamasi

Referensi	Jenis Studi	Hipotesa	Variabel	Jumlah Sampel	Pengelompokkan penelitian	Efek terhadap Kadar NO
Larrosa dkk., 2010	In vivo	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak delima Dependen Inflamasi kolon	Tikus Wistar Jantan	- Kelompok kontrol diberi pakan standar - Kelompok DSS (DSS) diet standar 25 hari + DSS 5% selama 5 hari terakhir percobaan : Kelompok DSS-PE dan DSS-UROA menerima makanan standar yang ditambah dengan PE 250 mg/kgBB/hari	↓NO dengan P<0,1 dibandingkan kelompok DSS

Keterangan : ↓ : menurunkan; NO : Nitric Oxide; DSS : Dextran Sodium Sulfat; PE : Pomegranate Extract; UROA : Urolithin-A; P.O : per oral; PFE : Pomegranate Fruit Extract.

Efek Ekstrak Delima terhadap Kadar NO pada Tikus Model Stres Oksidatif yang diinduksi oleh Infeksi

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Labsi dkk., (2015), disebutkan bahwa ekstrak maserasi kulit delima dengan dosis 500 µL yang diberikan pada tikus dengan induksi CE menyebabkan penurunan secara signifikan pada kadar NO sistemik dibandingkan dengan kelompok CE yang tidak diobati dengan $P < 0,0001$ seperti yang ditunjukkan dalam tabel 4. Selain itu, pada penelitian yang dilakukan oleh Hafiz dkk., (2015) pemberian ekstrak methanol 70% kulit delima menurunkan kadar NO secara signifikan dengan $p < 0,05$ pada kondisi *hepatic injury* dan kembali ke nilai normal serta penelitian oleh Mubarak dkk., (2016) dimana pemberian ekstrak methanol 70% kulit delima dapat menurunkan NO secara signifikan dengan $P < 0,05$ dibandingkan dengan kelompok infeksi yang tidak diberikan PPE.

Tabel 4 Efek Ekstrak Delima terhadap penurunan kadar NO pada kondisi Infeksi Parasit

Referensi	Jenis Studi	Hipotesa	Variabel	Jumlah Sampel	Pengelompokkan penelitian	Efek terhadap Kadar NO
Labsi dkk., 2016	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak kulit delima Dependen <i>echinococcus</i>	Tikus Albino Swiss Betina	5 Kelompok - Kelompok 1 : kelompok kontrol - Kelompok 2 (kelompok CE) : ip suspensi 2000 viable PSCs dalam 500 mL PBS steril - Kelompok 3 (Kelompok PGE/CE) : ip suspensi 2000 viable PSCs dalam 500 mL PBS steril + 500 mL PGE pada konsentrasi 0,65 g/kgBB/ hari 2 bulan, dari dua hari setelah infeksi. - Kelompok 4 (kelompok PBS) : PBS+ i.p. 500 mL PBS steril sebagai pengganti PSC - Kelompok 5 (kelompok PGE) : intragastrik 500 mL PGE pada konsentrasi 0,65 g/kgBB/ hari 2 bulan, dari dua hari setelah infeksi.	↓NO secara signifikan pada kelompok PGE/CE ($P < 0,0001$) dibandingkan dengan kelompok kontrol
Mubarak dkk., 2016	<i>In vivo</i>	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak kulit delima Dependen Kerusakan Spleen	30 Tikus Albino Swiss Jantan	3 Kelompok (n=10) - Kelompok 1 : kontrol - Kelompok 2 : induksi 10^6 P. <i>chabaudi-parasitized erythrocytes</i> - Kelompok 3 : induksi <i>P.chabaudi</i> + PPE 100 µl dari 300 mg/kg selama 6 hari	↓NO dengan $P < 0,05$ dibandingkan dengan kelompok <i>Infected (-PPE)</i>

Referensi	Jenis Studi	Hipotesa	Variabel	Jumlah Sampel	Pengelompokkan penelitian	Efek terhadap Kadar NO
Hafiz dkk., 2015	In vivo	Sesuai Hipotesa	Independen Ekstrak kulit delima Dependen Kerusakan hepar dan stres oksidatif	24 Tikus Albino Swiss	3 Kelompok (n=8) - Kelompok 1 : kontrol - Kelompok 2 : induksi 10^6 P. <i>chabaudi-parasitized erythrocytes</i> - Kelompok 3 : induksi <i>P.chabaudi</i> + PPE 100 μ l dari 300 mg/kg selama 6 hari	$\downarrow$ NO pada kelompok <i>infected</i> (+PPE) ($P<0,05$) dibandingkan kelompok <i>infected</i> (-PPE)

Keterangan : $\downarrow$: menurunkan; NO : Nitric Oxide; PGE : Pomegranate Peel Aqueous Extract; PSC : *Protoscolices*; i.p. : intraperitoneal; PPE : Pomegranate Peel Extract

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *Systematic Literature Review* (SLR). Melalui tahapan yang terdapat pada SLR (Gambar 1) , telaah dilakukan pada 14 jurnal internasional terakreditasi dengan tujuan untuk mengetahui serta membuktikan apakah benar bahwa delima (*Punica granatum*) yang memiliki kandungan antioksidan dapat berpengaruh terhadap kadar Nitric Oxide (NO) pada kondisi stres oksidatif dari berbagai sumber yang berbeda.

Potensi Antioksidan Ekstrak Delima terhadap Kadar NO pada Tikus Model Stres Oksidatif yang diinduksi oleh Injury

Pada penelitian yang dilakukan oleh Ahmed dkk., (2014), induksi *Ischemia/reperfusion* menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan enzim iNOS yang menstimulasi peningkatan NO. Kondisi tersebut menyebabkan terjadinya penumpukan radikal bebas berupa *peroxynitrite* yang tidak dapat ditangani oleh kapasitas antioksidan endogen (Ahmed dkk., 2014). Hal serupa juga terdapat pada hasil penelitian oleh Octunctemur dkk., (2015), dimana induksi UUO dapat meningkatkan kadar NO secara signifikan dengan $p<0,05$, dan penelitian oleh Jain dkk., (2013) dengan induksi TST yang dapat menyebabkan peningkatan NO akibat adanya disregulasi aktivitas reseptor dari PPAR gamma.

Secara umum, penurunan NO secara signifikan dapat terjadi disebabkan karena adanya kandungan antioksidan yang terdapat pada ekstrak buah delima. Ekstrak buah delima mengandung beberapa senyawa antioksidan seperti asam askorbat, vitamin E, polifenol, tanin, proantosianidin dan flavonoid. Dengan demikian, melalui kandungan senyawa yang dimiliki ekstrak buah delima dapat menekan peningkatan dari NO melalui peningkatan senyawa antioksidan. Selain menekan peningkatan NO, pada penelitian Ahmed dkk., (2014) juga disebutkan ekstrak buah delima juga dapat menekan jalur TNF- α dan caspase 3.

Penelitian oleh Jain dkk., 2013, menyebutkan bahwa pemberian ekstrak bunga delima dapat menyebabkan penurunan kadar NO. Ekstrak bunga delima memiliki efek agonistik PPAR γ , menghambat NO, aktivitas anti inflamasi dan penurunan indikator stres oksidatif. (Jain dkk., 2013)

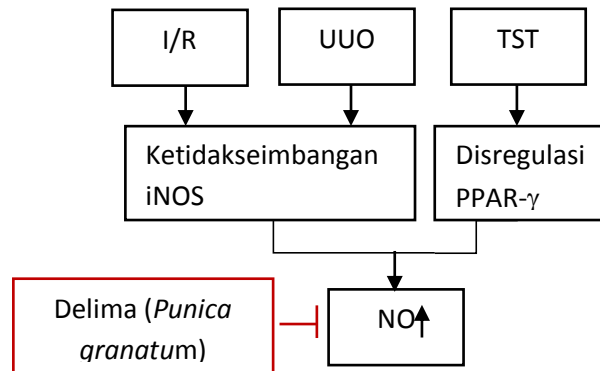


Diagram 1 Potensi Delima terhadap kadar NO oleh induksi injury

Potensi Antioksidan Ekstrak Delima terhadap Kadar NO pada Tikus Model Stres Oksidatif yang diinduksi oleh Toksisitas

Induksi GEN pada model hewan coba dapat meningkatkan kadar NO secara signifikan seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Cekmen dkk., (2013) dan Sadeghi dkk., (2015). Mekanisme umum terjadinya kerusakan ginjal oleh induksi GEN dilaporkan akibat adanya peningkatan jumlah radikal bebas dan kerusakan *Brush Border Membran* (BBM) serta mitokondria (Cekmen dkk., 2013). Ekstrak buah delima memiliki efek protektif terhadap ginjal melalui mekanisme pencegahan peningkatan serum urea dan kreatinin. Di sisi lain, penelitian ini juga menyebutkan bahwa PE tidak dapat mempengaruhi NO secara protektif dimana berbeda dengan beberapa penelitian sebelumnya. Walaupun tidak mempengaruhi NO, PE pada penelitian ini tetap dapat menyebabkan perubahan pada LPO melalui jalur lain. Sehingga, penemuan ini dapat dijadikan bukti bahwa PE memiliki peranan penting dalam melindungi ginjal akibat induksi GEN melalui perbaikan status oksidan tidak hanya pada NO (Cekmen dkk., 2013).

Keadaan stres oksidatif akibat toksisitas juga dapat dilihat pada hasil penelitian oleh Moneim dkk., (2013 dan Moneim dkk., (2016). Pemberian $AlCl_3$ akan menginduksi terjadinya lipid peroksidasi, kerusakan oksidatif DNA dan kebocoran elektron yang akan mengakibatkan peningkatan produksi NO (Moneim dkk., 2013). Pemberian ekstrak methanol kulit delima dapat mencegah terjadinya toksisitas pada hepatorenal tikus yang diinduksi dengan $AlCl_3$. Kandungan utama ekstrak methanol kulit delima yang dilaporkan berkontribusi antara lain flavonoid dan fenolik melalui mekanisme pembersihan radikal bebas dan perlindungan aktivitas enzim antioksidan. Dengan demikian, secara langsung pengobatan dengan MEPP dapat meningkatkan fungsi dari membran sel dan organ serta mengembalikan semua dalam nilai normal. Moneim dkk., (2016) melaporkan hal yang serupa, yakni penggunaan ekstrak methanol kulit delima dengan dosis dan komposisi yang sama dapat menurunkan kadar LPO dan NO secara signifikan disertai peningkatan GSH dengan $p < 0,05$ pada homogenat jaringan otak yang mengalami stres oksidatif akibat induksi $AlCl_3$ melalui mekanisme yang sama disebutkan melalui penelitian Moneim dkk., (2013).

Hasil induksi DMBA dan CCl_4 menunjukkan hasil yakni terjadinya penurunan dari aktivitas antioksidan salah satunya GSH yang disebabkan oleh ROS sehingga terjadi akumulasi radikal bebas yang berlebihan dan menimbulkan kondisi stres oksidatif (Ahmed dkk., 2016). Ekstrak infusa biji dan kulit delima dapat menurunkan NO pada kondisi toksisitas dilaporkan dalam penelitian Ahmed dkk., (2016). Pemberian ekstrak biji dan kulit delima serta campurannya dapat memberikan efek perbaikan terhadap ginjal, perbaikan fungsi ginjal serta penurunan indikator stres oksidatif (Tugcu dkk., 2008; Ahmed dkk., 2016). Penelitian tersebut menyebutkan bahwa, pemberian ekstrak biji dan kulit delima serta campurannya selain dapat berpengaruh terhadap ginjal, juga dapat memberikan perlindungan pada jantung dengan meningkatkan fungsi dan integritas histologi otot jantung. Kondisi tersebut dilaporkan terjadi melalui mekanisme aktivitas antioksidan pada delima yang akan menyebabkan efek

pembersihan radikal bebas dan berperan sebagai antioksidan sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan miokardium (Ahmed dkk., 2016).

Hasil berbeda ditunjukkan pada penelitian El-Habibi dan El-Sayed (2013) dan Motamedi dkk (2014). Pemberian induksi Adenine pada penelitian El-Habibi dan El-Sayed (2013) akan menurunkan kadar NO. Penurunan kadar NO dilaporkan terjadi karena adanya formasi lokal CRP pada endotel saat terjadi inflamasi ginjal (El -Habibi dan El-Sayed, 2013). Selain itu, penurunan NO juga terdapat pada hasil induksi Cisplatin pada penelitian Motamedi dkk., (2014) yang disebabkan karena adanya kerusakan endothelium sehingga menyebabkan terjadinya gangguan sintesis eNOS. Pemberian ekstrak methanol kulit delima dilaporkan menyebabkan peningkatan kadar NO. Efek protektif terhadap ginjal oleh pemberian ekstrak methanol kulit delima ini melibatkan mekanisme aktivasi jalur persinyalan yang diperankan oleh NO dan *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR- γ) (Singh dkk., 2011). Hasil yang sama ditunjukkan oleh Motamedi dkk., (2014), pemberian ekstrak hidroalkoholik bunga delima dengan dosis rendah dapat menyebabkan peningkatan signifikan kadar NO pada tikus model nefrotoksitas. Peningkatan kadar NO ini merupakan salah satu efek protektif bunga delima untuk melindungi ginjal dari disfungsi endotel akibat induksi CP. Hal tersebut juga didukung oleh penelitian lainnya yang serupa, bahwa ekstra hidroalkoholik bunga delima dapat berpotensi dalam membantu perbaikan fungsi ginjal melalui jalur persinyalan yang bergantung pada NO (Singh dkk., 2011).

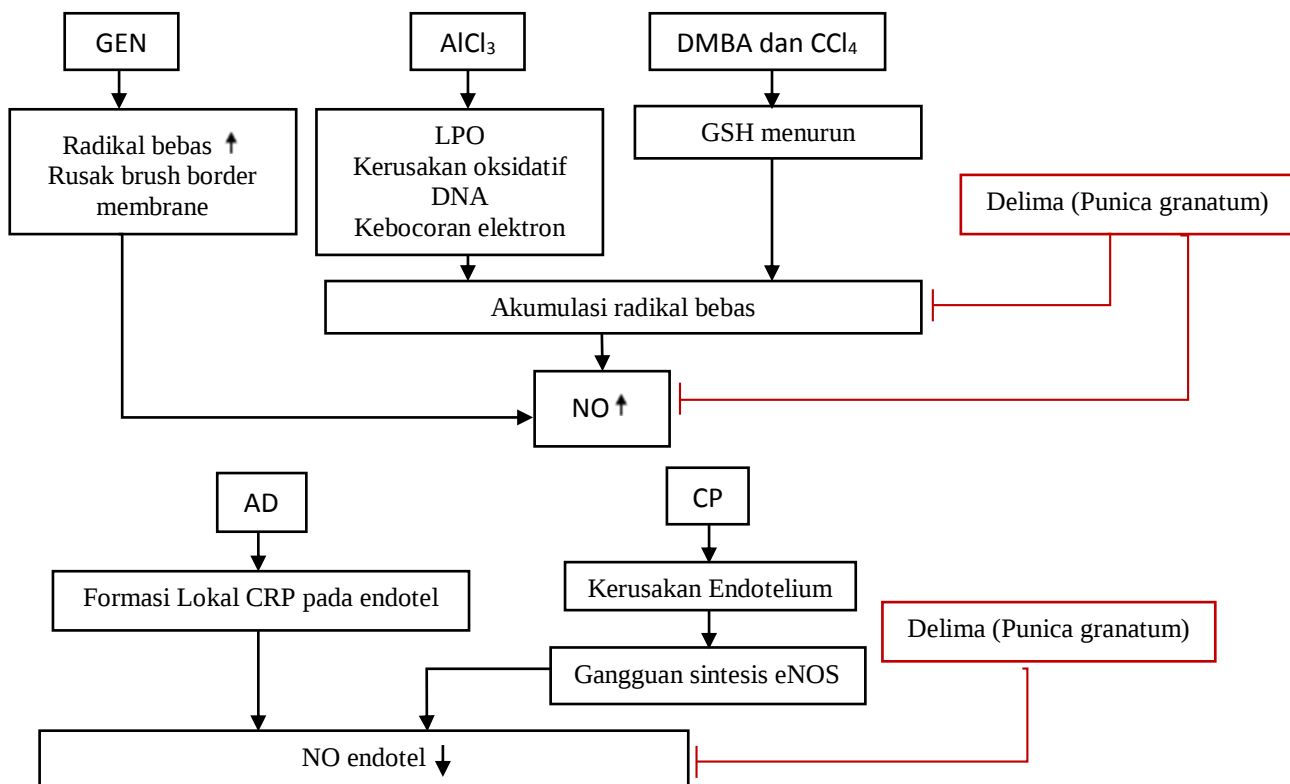


Diagram 2 Potensi Delima terhadap kadar NO oleh induksi toksisitas

Potensi Antioksidan Ekstrak Delima terhadap Kadar NO pada Tikus Model Stres Oksidatif yang diinduksi oleh Inflamasi

Pemberian induksi DSS dapat menyebabkan terjadinya peningkatan signifikan terhadap kadar NO. Penyakit radang usus yang disebabkan oleh induksi DSS ini akan mengakibatkan peningkatan ROS dalam jumlah besar oleh neutrofil dan makrofag yang direkrut oleh jaringan yang meradang serta penurunan dari antioksidan endogen. Kondisi inflamasi ini juga akan mengakibatkan munculnya sitokin pro inflamasi seperti TNF α dan IL-1 β dan menginduksi

produksi dari ROS (Larrosa dkk., 2010). Hasil dalam penelitian ini menunjukkan bahwa suplementasi PE mampu membatalkan produksi NO dengan menghambat langsung ekspresi iNOS yang disebabkan oleh induksi DSS.

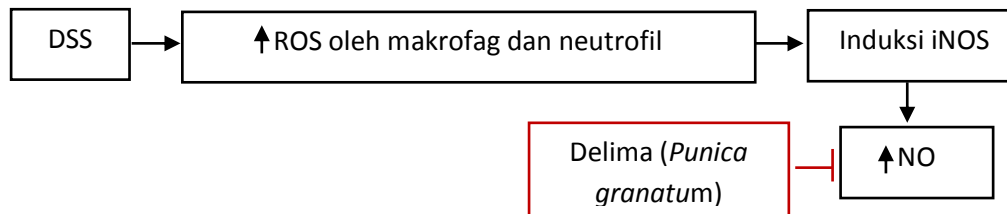


Diagram 3 Potensi Delima terhadap kadar NO oleh induksi inflamasi

Potensi Antioksidan Ekstrak Delima terhadap Kadar NO pada Tikus Model Stres Oksidatif yang diinduksi oleh Infeksi

Penelitian oleh Labsi dkk., (2016), menyebutkan bahwa induksi *E.granulosus* menyebabkan terjadinya peningkatan secara signifikan NO plasma dari angka $(19.17 \pm 0.58) \mu\text{M}$ menjadi $(2.74 \pm 0.42) \mu\text{M}$ dengan $P < 0,0001$. beberapa penelitian menyebutkan bahwa NO akibat induksi *E.granulosus* diproduksi oleh monosit atau makrofag yang diinduksi oleh aktivitas toksik dari infeksi. Efek toksik ini diinduksi oleh NO yang ada di kista hidatidosa (Ait Aissa dkk., 2006; Labsi dkk., 2016). Pemberian PGE dapat menurunkan kadar NO melalui mekanisme efek secara langsung terhadap penghambatan produksi NO dan $\text{TNF-}\alpha$.

Plasmodium chabaudi merupakan salah satu dari 4 jenis malaria yang dapat menginfeksi manusia dan menimbulkan reaksi patologis maupun imunologis (Stephens dkk., 2011). Pemberian induksi *p.chabaudi* dapat meningkatkan kadar NO, dilaporkan pada penelitian Mubarak dkk., (2016) dalam kondisi *spleen injury* dan Hafiz dkk., (2015) dalam kondisi *hepatic injury*. Mekanisme induksi *p.chabaudi* menyebabkan peningkatan NO melalui induksi sitokin proinflamasi. Pengeluaran sitokin inflamasi yang terjadi antara lain interleukin 1β , $\text{TNF-}\alpha$, iNOS, dan $\text{IFN-}\gamma$. Keberadaan sitokin akibat induksi *p.chabaudi* tersebut memiliki peranan penting dalam mempengaruhi keparahan suatu penyakit (Mubarak dkk., 2016). Pengobatan ekstrak methanol 70% kulit delima dapat menurunkan kadar NO melalui pertahanan antioksidan enzimatis (Hafiz dkk., 2015) dan mengurangi secara langsung produksi NO dan MDA serta dengan sementara menghambat penurunan katalase yang diinduksi oleh infeksi (Mubarak dkk., 2016)

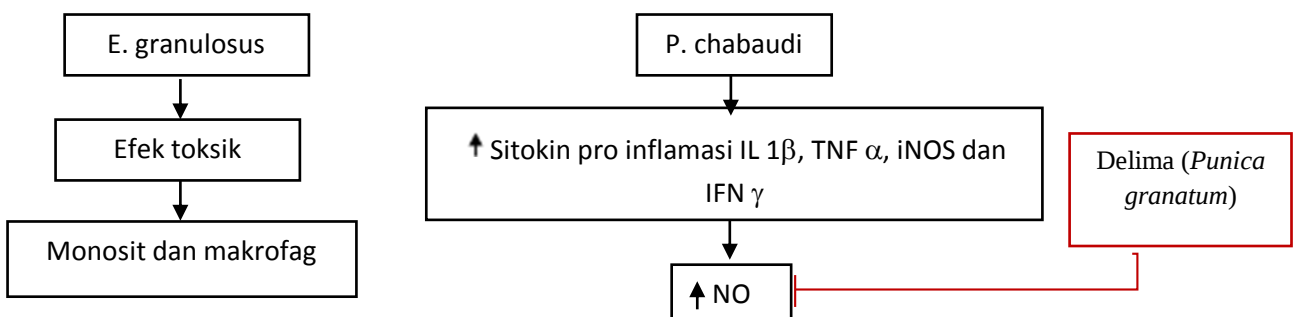


Diagram 4 Potensi Delima terhadap kadar NO oleh induksi infeksi

KESIMPULAN

Melalui *Systematic Literature Review* (SLR) pada 14 jurnal yang dipilih melalui kriteria inklusi, telah dibuktikan adanya potensi delima terhadap kondisi stres oksidatif. Pemberian ekstrak buah, biji, kulit, dan bunga delima (*Punica granatum*) yang memiliki kandungan antioksidan tinggi terutama polifenol dapat memberikan efek antioksidan. Mekanisme

antioksidan yang diberikan dapat berupa peningkatan maupun penurunan kadar *Nitric Oxide* (NO) pada model hewan coba dengan kondisi stres oksidatif baik yang diinduksi secara *injury*, toksisitas, inflamasi maupun infeksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, M. A. E., El Morsy, E. M. and Ahmed, A. A. E. (2014) 'Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats', *Life Sciences*. Elsevier B.V., 110(2), pp. 61–69. doi: 10.1016/j.lfs.2014.06.023.
- Ahmed, O. and M. Ashour *et al.* (2016) 'Ameliorative Effects of Punica Granatum Juice and Extracts against 7,12-Dimethylbenz (a) Anthracene and Carbon Tetrachloride-Induced Cardiorenal Toxicity in Albino Rats', *SM J Biol*, 2(2)
- Ait Aissa S, Amri M, Bouteldja R, Weitzerbin J, Touil-Boukoffa C. Alterations in interferon-gamma and nitric oxide levels in humain echinococcosis. *Cell Mol Biol* 2006; 52(1): 65-70
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007)'Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis' *JAMA*. 2007;297:842-857
- Bjelakovic, G. and D. Nikolova *et al.* (2015) 'Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases', *Sao Paulo Medical Journal*, 133(2), p. 164. doi: 10.1590/1516-3180.20151332T1.
- Cekmen, M. and A. Otunctemur *et al.* (2013) 'Pomegranate extract attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats by reducing oxidative stress', *Renal Failure*, 35(2), pp. 268–274. doi: 10.3109/0886022X.2012.743859.
- El-Habibi, El-Sayed M. (2013) 'Renoprotective Effects of *Punica granatum* (Pomegranate) Against Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Male Rats' *Life Science Journal* 2013;10(4).
- Francenia Santos-Sánchez and R. Salas-Coronado, N. *et al.* (2019) 'Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism', *Antioxidants*, pp. 1–28. doi: 10.5772/intechopen.85270.
- Habib, S. and Ali, A. (2011) 'Biochemistry of nitric oxide', *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26(1), pp. 3–17. doi: 10.1007/s12291-011-0108-4.
- Hafiz, T. A. and M. Mubarak *et al.* (2016) 'The potential role of Punica granatum treatment on murine malaria-induced hepatic injury and oxidative stress', *Parasitology Research*, 115(4), pp. 1427–1433. doi: 10.1007/s00436-015-4876-2
- Jain, V. and A. Pareek *et al.* (2013) 'Attenuating effect of standardized fruit extract of punica granatum L in rat model of tibial and sural nerve transection induced neuropathic pain', *BMC Complementary and Alternative Medicine*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13(1), p. 1. doi: 10.1186/1472-6882-13-274
- Labsi, M. and Khelfi *et al.* (2016) 'Antihydatic and immunomodulatory effects of Punica granatum peel aqueous extract in a murine model of echinococcosis', *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(3), pp. 211–220. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.01.038.
- Larrosa, M. and Gonzalez Sarrias *et al.* (2010) 'Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism', *Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier Inc., 21(8), pp. 717–725. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.04.012.
- Leonidou, A. and P. Lepetsos *et al.* (2018) 'Expert Opinion on Therapeutic Targets Inducible nitric oxide synthase as a target for osteoarthritis treatment', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*.

- Taylor & Francis, 00(00), pp. 1–20. doi: 10.1080/14728222.2018.1448062
- Moneim, A. and Ahmed E *et al.* (2013) ‘Pomegranate peel attenuates aluminum-induced hepatorenal toxicity’, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(8), pp. 624–633. doi: 10.3109/15376516.2013.823634.
- Moneim, Abdel E., A. (2016) ‘Evaluating the potential role of pomegranate peel in aluminum-induced oxidative stress and histopathological alterations in brain of female rats’, *Biological Trace Element Research*, 150(1–3), pp. 328–336. doi: 10.1007/s12011-012-9498-2.
- Motamedi, F. and M. Nematbakhsh *et al.* (2014) ‘Effect of pomegranate flower extract on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats’, *Journal of Nephropathology*, 3(4), pp. 133–138. doi: 10.12860/jnp.2014.26.
- Mubarak, M. A. and T. Hafiz *et al.* (2016) ‘Beneficial effect of Punica granatum peel extract on murine malaria-induced spleen injury’, *BMC Complementary and Alternative Medicine*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s12906-016-1207-9
- Omer, N. and A. Rohilla *et al.* (2012) ‘Review article nitric oxide: role in human biology.’, *Int. J. Pharma. Sci. Drug Res.*, 4(2), pp. 105–109
- Otuntemur, A. and E. Ozbek *et al.* (2015) ‘Pomegranate extract attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal damage by reducing oxidative stress’, *Urology Annals*, 7(2), pp. 166–171. doi: 10.4103/0974-7796.150488
- Pacher P, Beckman JS, L. L. (2017) ‘Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.’, *Physiol Rev* 87(1), pp. 315–424.
- Preiser, J. C. (2012) ‘Oxidative stress’, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(2), pp. 147–154. doi: 10.1177/0148607111434963.
- Rasheed, Z. (2016) ‘Intake of pomegranate prevents the onset of osteoarthritis: Molecular evidences’, *International Journal of Health Science*, 10(2), pp. V–VIII. doi: 10.12816/0048807
- Sadeghi, F. and M. Nematbakhs *et al.* (2015) ‘Protective effect of pomegranate flower extract against gentamicin-induced renal toxicity in male rats.’, *Journal of renal injury prevention*, 4(2), pp. 45–50. doi: 10.12861/jrip.2015.10.
- Singh AP, Singh AJ, Singh N. (2011): Pharmacological investigations of *Punicagranatum* in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Indian J Pharmacol* 2011;43:551- 556
- Spilmont, Melanie, Leotoing, Lauent, Davicco, Marie-Jeanne *et al.* 2015. Pomegranate Peel Extract Prevents Bone Loss in a Preclinical Model of Osteoporosis and Stimulates Osteoblastic Differentiation *in Vitro*. *Nutrients* 2015, 7, 9265–9284; doi:10.3390/nu7115465
- Stephens R, Culleton RL, Lamb TJ. The contribution of Plasmodium chabaudi to our understanding of malaria. *Trends Parasitol.* 2012;28(2):73-82. doi:10.1016/j.pt.2011.10.006
- Tugcu V, Kemahli E, Ozbek E, Arinci YV, Uhri M, Erturkuner P, *et al.* Protective effect of a potent antioxidant, pomegranate juice, in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Endourol.* 2008; 22: 2723-2731