

## THE EFFECT OF ENCAPSULATED MULBERRY (*Morus alba* L.) LEAVES EXTRACT ON ARTERIAL BLOOD PRESSURE IN RATS

### PENGARUH ENKAPSULASI EKSTRAK DAUN MURBEI (*Morus alba* L.) TERHADAP TEKANAN DARAH ARTERI PADA TIKUS

Siti Aminah\*, Suwaldi, Achmad Fudholi, Wahyono

Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara Yogyakarta, Indonesia

#### ABSTRACT

Rutin and quercetin are flavonoid compounds containing in the extract of mulberry (*Morus alba* L.) leaves have an influence on the cardiovascular system. This study aims to assessment of the blood pressure effect and cardiac puls after giving ethanolic extract of mulberry leaves. The extract was made using 95% ethanol by remaseration method. The content of rutin and quercetin in the extract were determined by using HPLC(High Performance Liquid Chromatography). The formula of the encapsulation containing extract 0.25% w/v, chitosan 0.5mg/mL and TPP (sodium tripolyphosphate) 1mg/mL. Characterization of extract encapsulated was done on the particle size, encapsulation efficiency and FTIR. Extract encapsulated was given to rats orally, subsequently arterial blood pressure and heart rate were measured using Coda Non-Invasive Blood Pressure System. The results showed that mulberry extract contains rutin (0.879±0.138) mg/g and quercetin (4.427±0.065) mg/g. Ratio of chitosan-TPP with 0.5:1 forms particle size were 25.11-45.2 nm, encapsulation efficiency (76.14±2.29)%. Mulberry leaves extract and encapsulated extract could decrease arterial blood pressure.

Keywords: encapsulation, mulberry leaves extract, chitosan, blood pressure, heart rate

#### ABSTRAK

Rutin dan kuersetin merupakan senyawa golongan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) dan mempunyai pengaruh dalam sistem kardiovaskuler. Pada penelitian ini diteliti pengaruh enkapsulasi ekstrak daun murbei terhadap tekanan darah arteri. Ekstrak dibuat secara remaserasi dengan menggunakan penyari etanol 95%. Kandungan rutin dan kuersetin didalam ekstrak ditentukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Enkapsulasi dilakukan terhadap 0,25% ekstrak, menggunakan kitosan 0,5mg/mL dan TPP 1mg/mL. Karakterisasi dilakukan terhadap ukuran partikel, efisiensi enkapsulasi dan Spektroskopi Infra Merah-Fourier Transform. Ekstrak dengan dosis 1g/kg berat badan dan ekstrak terenkapsulasi dengan dosis 1,313g/kg berat badan kemudian diberikan secara per oral pada tikus normotensif maupun tikus hipertensif, selanjutnya diukur tekanan darah arteri dan frekuensi denyut jantung dengan menggunakan Coda Non-Invasive Blood Pressure System. Hasil menunjukkan bahwa kadar rutin dan kuersetin dalam ekstrak adalah (0,87±0,138) mg/g dan (4,427±0,065) mg/g. Kitosan-TPP dengan perbandingan 0,5:1 membentuk partikel dengan ukuran antara 25,11-45,21nm dan efisiensi enkapsulasi (76,14±2,29) % pada enkapsulasi ekstrak daun murbei. Ekstrak daun murbei dan ekstrak daun murbei terenkapsulasi dapat menurunkan tekanan darah arteri.

Kata kunci : enkapsulasi, ekstrak daun murbei, kitosan, tekanan darah, frekuensi denyut jantung

#### PENDAHULUAN

Penggunaan obat-obat yang berasal dari hasil alam terlihat makin meluas dewasa ini. Mengingat sampai saat ini masih banyak masyarakat yang menderita hipertensi, baik itu dari golongan rendah, menengah maupun tinggi dan juga untuk mengimbangi penggunaan obat-obat sintesis maka perlu alternatif obat

antihipertensi yang lain. Salah satu tanaman yang banyak terdapat di Indonesia, tumbuh liar di hutan-hutan, ada juga yang ditanam orang di halaman dan dikebun-kebun sebagai tanaman buah-buahan serta banyak digunakan untuk memelihara ulat sutera, adalah tanaman murbei (*Morus alba* L.). Secara tradisional daunnya digunakan untuk menurunkan tekanan darah arteri (Perry, 1980; Dalimartha *et al.*, 1999).

Flavonoid merupakan konstituen utama dalam daun murbei (*Morus alba* L.) dan memiliki

Corresponding author : Siti Aminah  
E-mail: aminah\_amin\_min@yahoo.com

berbagai aktivitas farmakologis (Wang *et al.*, 2008). Senyawa flavonoid yang terdapat dalam daun murbei antara lain rutin dan kuersetin yang mempunyai polifenol. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Stojanovic *et al.* (2012) menunjukkan potensi enkapsulasi polifenol tanaman untuk meningkatkan fungsionalitas dan stabilitas produk. Umumnya industri makanan menggunakan *spray drying* pada metoda enkapsulasi (Ahmed *et al.*, 2010). Pada penelitian sebelumnya, diketahui bahwa enkapsulasi meningkatkan absorpsi *in-vitro* kandungan rutin dan kuersetin dalam ekstrak daun murbei yang terenkapsulasi (Aminah *et al.*, 2014).

Pada penelitian yang dilakukan Edwards *et al.* (2007) diketahui bahwa kuersetin dapat mengurangi tekanan darah pada subjek yang mengalami hipertensi. Penelitian laboratorium yang lain telah menunjukkan bahwa kuersetin memiliki sifat penting sebagai vasorelaksan pada arteri terisolasi dan menurunkan tekanan darah pada tikus hipertensi spontan (Duarte *et al.*, 1993). Salah satu faktor yang mempengaruhi tekanan darah arteri adalah *cardiac output*. Sedangkan *cardiac output* dipengaruhi oleh frekuensi denyut jantung, dengan demikian perubahan tekanan darah yang terjadi secara fisiologis dapat diketahui salah satu penyebabnya (Rushmer, 1976; Keele *et al.*, 1982). Salah satu zat yang juga dapat mempengaruhi tekanan darah adalah Mn/mangan (Braunwald, 1982) yang sering terdapat di dalam tanaman, oleh karena itu perlu ditetapkan zat ini di dalam ekstrak. Dalam penelitian ini dilihat efek ekstrak dan enkapsulasi ekstrak daun murbei terhadap tekanan darah serta frekuensi denyut jantung.

## METODOLOGI

### Bahan dan Alat

Daun murbei (*Morus alba* L.) diperoleh dari daerah Sleman Yogyakarta, tikus jantan (*Ratus Norwegicus*) strain *Sprague-Dawley* (SD) diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM dengan berat badan 270 -320 gram, akuades (General Labora), air untuk KCKT (Merck, Jerman), etanol 95 % teknis (Jayamas Medica Industri), etanol 95 % p.a.(Merck, Jerman) metanol untuk KCKT gradient grade (Merck, Jerman), asam asetat p.a. (Merck, Jerman), kitosan *medical grade* (Biotech Surindo, Indonesia), natrium tripolifosfat/TPP (Sigma-Aldrich, Jerman), asetonitril untuk KCKT (Merck, Jerman), rutin dan kuersetin pembanding (Sigma-Aldrich, Jerman), PEG 400 (teknis), fenilefrin HCl (Sigma, Jerman),

Coda Non- Invasive Blood Pressure (Kent Scientific, USA). HPLC D-2000 Elite LaChrome dengan detektor UV-Vis L-2420, pompa Hitachi L-2130, Soft ware Elite LaChrome Sampel injector 20 µL sampel Lop (Hitachi, Jepang), *Column* yang digunakan Nucleodur Sphinx RP,150 x 4,6 mm,5µm (Macherey-Nagel, Jerman), transmission electron microscopy/TEM (JEOL JEM-1400, Jepang) , FT-IR (PerkinElmer, USA), saringan millipore ukuran 0,45 µm, centrifuge EBA 8 (Hettich, Jerman), moisture analyzer MB 35 Halogen (OHAUS, Switzerland), *rotary evaporator* (RE 300, Stuart), *spray-drying* (LabPlant, USA), AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*), oven (Memmert, Jerman) , alat pengayak (Erweka, Jerman).

### Cara penelitian

#### Pembuatan serbuk daun murbei.

Daun murbei diambil dari daerah Sleman Yogyakarta kemudian dilakukan determinasi tanaman di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM. Daun dicuci dengan air, dikeringkan dalam oven 50° C selama 40 jam dan kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender dengan kecepatan 1 selama 20 detik, selanjutnya diayak dengan menggunakan ayakan 40 mesh. Ditetapkan kadar airnya dengan menggunakan *moisture analyzer* kemudian disimpan dalam botol dengan diberi pengering silikagel.

#### Pembuatan ekstrak daun murbei dan penetapan kadar rutin dan kuersetin

Pembuatan ekstrak daun murbei dilakukan secara remaserasi (Anonim, 1986). Serbuk daun murbei 400 gram ditambah 4 liter etanol 95 % dalam bejana tertutup didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya disaring dan diperas, ampas ditambah 4 liter etanol 95 %, didiamkan selama 24 jam, disaring dan diperas. Maserat yang diperoleh kemudian dicampur, diuapkan dengan menggunakan evaporator sampai jumlah setengahnya, selanjutnya diuapkan sehingga kental. Rutin dan kuersetin dalam ekstrak ditetapkan kadarnya dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Nie *et al.*, 2012, Zhishen *et al.*, 1999). Dibuat larutan 0,125 % ekstrak dalam etanol 30 %, kemudian disaring menggunakan saringan 0,45 µm, selanjutnya hasil penyaringan sebanyak 20 µl diinjeksikan ke HPLC. Eluen yang digunakan Metanol-Air (60:40 v/v) dengan kecepatan alir 1,000 ml/menit, pada λ 270 nm. Ditentukan juga kadar Mn dalam ekstrak dengan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*) nyala.

### Pembuatan ekstrak daun murbei terenkapsulasi

Ekstrak daun murbei dengan kadar 0,25% b/v dicampur dengan larutan kitosan dan larutan natrium trifolifosfat kemudian dikeringkan menggunakan *spray drying* (Munin and Edward-Lévy, 2011). Kitosan yang digunakan dengan kadar 0,5 mg/ml dilarutkan dalam asam asetat pH 5. Natrium trifolifosfat yang digunakan adalah 1 mg/ml. Selanjutnya dilakukan karakterisasi enkapsulasi berupa ukuran partikel dan efisiensi enkapsulasi, sedangkan untuk interaksi antara ekstrak dengan kitosan dan TPP dikarakterisasi dengan FTIR (*Fourier transform infrared*).

### Uji tekanan darah dan frekuensi denyut jantung

Pada uji ini digunakan rancangan percobaan *Pretest-Posttest Control Group Design*. Hewan coba yang digunakan berjumlah 30 ekor, dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing berjumlah 5 ekor. Penempatan hewan coba ke dalam kelompok tersebut secara acak. Ekstrak dengan dosis 1gram/kg BB dan ekstrak terenkapsulasi dengan dosis 1,313 gram/kg BB dalam PEG 400 diberikan pada hewan coba normotensif per oral, kemudian tekanan sistole, tekanan diastole dan frekuensi denyut jantung dicatat setiap 30 menit. Dilakukan juga hal tersebut dengan pemberian PEG 400 sebagai kontrol. Untuk meningkatkan tekanan darah spontan digunakan fenilefrin *s.c.(sub cutan)* serta diberikan 15 menit sebelum pemberian ekstrak, ekstrak terenkapsulasi dan PEG 400.

Data tekanan darah arteri diperoleh dengan perhitungan dari tekanan diastole + 1/3 tekanan pulsus (*pulse pressure*) (Lamina, *et al*, 2005; Höcht, *et al*, 2006) selanjutnya tekanan darah arteri dan frekuensi denyut jantung dianalisis dengan analisa kovariansi. Pengukuran awal pemberian merupakan kovariabel (Snedecor dan Cochran, 1980).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penetapan kadar air di dalam serbuk daun murbei adalah  $(7,83 \pm 0,26)$  %. Hasil penetapan kadar rutin dan kuersetin dalam ekstrak kental daun murbei adalah  $(0,879 \pm 0,138)$  mg/g dan  $(4,427 \pm 0,065)$  mg/g. Kandungan Mn dalam ekstrak adalah  $(0,77 \pm 0,10)$  ppm. Enkapsulasi ekstrak daun murbei menggunakan kitosan-TPP dengan perbandingan 0,5:1 membentuk partikel dengan ukuran antara 25,11–45,21 nm serta efisiensi enkapsulasi  $(76,14 \pm 2,29)$  %. Hasil pemeriksaan ekstrak terenkapsulasi dengan menggunakan TEM dapat dilihat seperti pada gambar 1

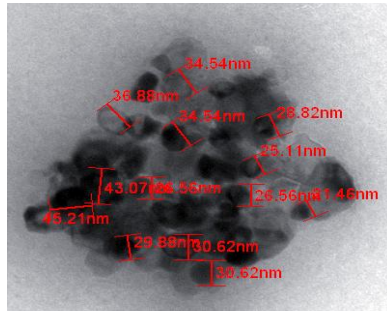
Hasil spektroskopi FT-IR dari kitosan-TPP, ekstrak terenkapsulasi dapat dilihat pada gambar 2 dan gambar 3.

Pada kitosan, suatu pita terpisah (*splitted band*) dapat diamati pada bilangan gelombang ( $3430\text{cm}^{-1}$  dan  $2877\text{cm}^{-1}$  yang diratakan oleh interaksi dengan TPP ( $3398\text{cm}^{-1}$ ) menjadi lemah dan luas seperti nampak pada gambar 2. Pita pada bilangan gelombang  $3438\text{cm}^{-1}$  terlihat untuk spektra ekstrak terenkapsulasi (gambar 3) yang menunjukkan interaksi antara polifenol yang terkandung di dalamnya dengan kitosan-TPP, yang ditunjukkan oleh adanya ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen mempunyai energi 2-8kcal/mol (Sinko, 2006). Terjadi perubahan *transmittance* (T) dari sekitar 3,9% ke 2,5% yang menunjukkan adanya interaksi antara ekstrak dengan kitosan-TPP. Suatu pergeseran  $40\text{cm}^{-1}$  pada pita serapan di daerah uluran O-H menjadi berubah frekuensinya, menegaskan bahwa polifenol terikat pada kitosan dan tripolifosfat. Rutin dan kuersetin dalam ekstrak mempunyai gugus OH sehingga mempunyai parsial negatif, kemudian kitosan dalam lingkungan asam mempunyai gugus amin kationik yaitu  $\text{NH}_3^+$ , dengan demikian muatan  $\text{NH}_3^+$  dan OH parsial negatif akan memungkinkan terjadi interaksi ionik, yang memungkinkan rutin dan kuersetin terperangkap dalam enkapsulasi. Penetrasi molekul obat ke dalam jaringan kitosan dapat terjadi baik oleh interaksi elektrostatik antara kelompok  $-\text{NH}_3^+$  dengan kelompok fosfat dari natrium tripolifosfat serta ikatan hidrogen antara gugus OH polifenol dan gugus OH dari kitosan (Stoica *et al.*, 2013). Ekstrak daun murbei juga mengandung gugus OH polifenol sehingga memungkinkan penetrasi ini terjadi pada enkapsulasi ekstrak tersebut.

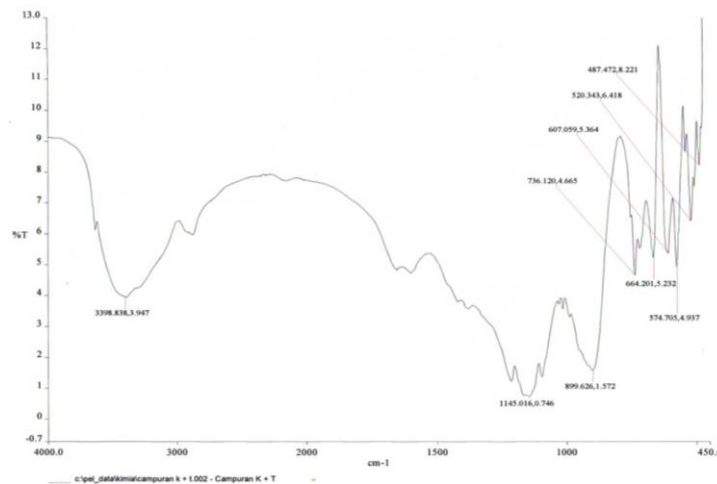
Hasil pengukuran tekanan sistole dan diastole yang diperlihatkan dengan tekanan darah arteri rata-rata ekstrak daun murbei (E) serta ekstrak terenkapsulasi (EM) pada hewan coba normotensif disajikan pada gambar 4.

Dari hasil penentuan tekanan darah setelah 2 jam pemberian per oral pada tikus normotensif menunjukkan terjadi penurunan tekanan darah baik pada pemberian ekstrak maupun ekstrak terenkapsulasi bila dibandingkan dengan kontrol ( $p < 0.05$ ). Penurunan tekanan darah arteri pada pemberian ekstrak sebesar 5,95 %, sedangkan pada pemberian ekstrak terenkapsulasi menunjukkan penurunan tekanan darah sebesar 13,70 % pada tikus normotensif.

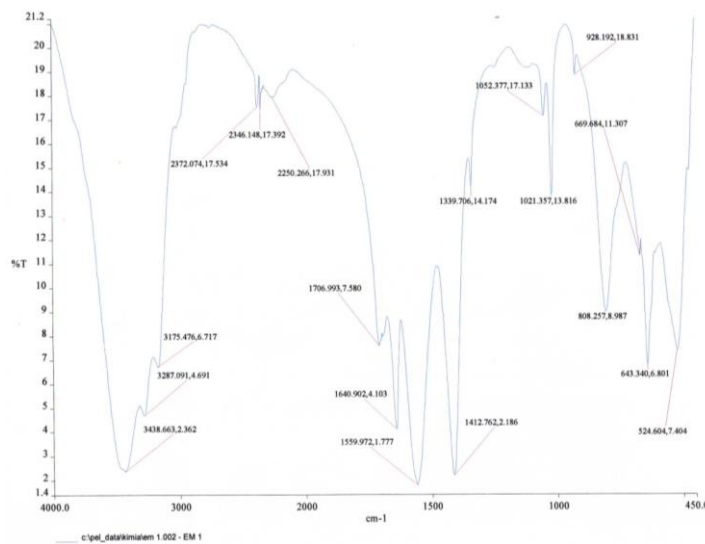
Tekanan darah pada pemberian ekstrak dan ekstrak terenkapsulasi pada hewan coba hipertensif karena pemberian fenilefrin *sub cutan* (*s.c.*) dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 1. Partikel pada ekstrak daun murbei terenkapsulasi



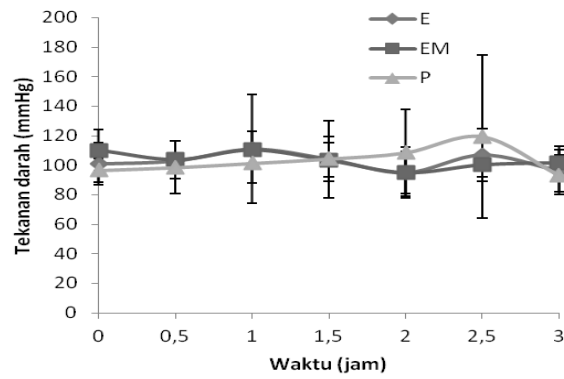
Gambar 2. Spektra Kitosan-T



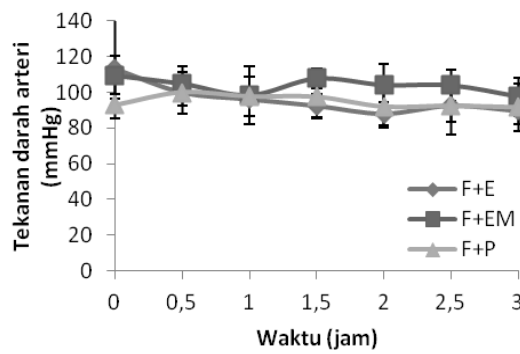
Gambar 3. Spektra ekstrak terenkapsulasi

Dari hasil penentuan tekanan darah pada 2 jam pemberian per oral pada tikus hipertensif menunjukkan bahwa terjadi penurunan tekanan darah baik pada pemberian ekstrak maupun ekstrak terenkapsulasi bila dibandingkan dengan

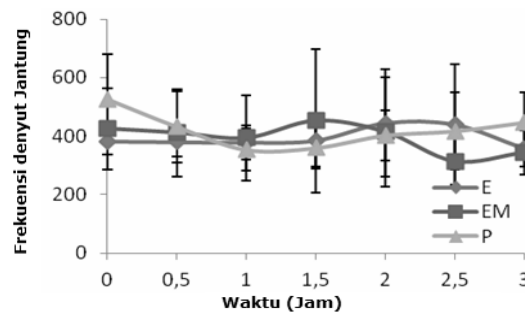
kontrol ( $p < 0.05$ ). Penurunan tekanan darah arteri pada pemberian ekstrak sebesar 22,45%, sedangkan pada pemberian ekstrak terenkapsulasi menunjukkan penurunan tekanan darah sebesar 4,93 % pada tikus hipertensif.



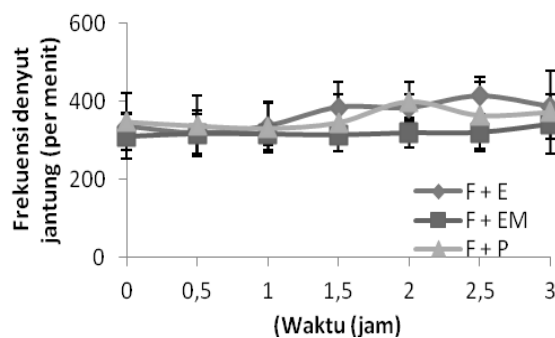
Gambar 4. Tekanan darah pemberian ekstrak (E), ekstrak terenkapsulasi (EM) dan kontrol (P) pada tikus normotensif



Gambar 5. Tekanan darah pemberian ekstrak (E), ekstrak terenkapsulasi (EM) dan kontrol (P) pada tikus hipertensif



Gambar 6. Frekuensi denyut jantung pemberian ekstrak (E), ekstrak terenkapsulasi (EM) dan kontrol (P) pada tikus normotensif



Gambar 7. Frekuensi denyut jantung pemberian ekstrak (F+E), ekstrak terenkapsulasi F+(EM) dan kontrol (F+P) pada tikus hipertensif

Menurunnya tekanan darah arteri pada pemberian ekstrak terenkapsulasi terlihat lebih perlahan dari pada pemberian ekstrak dari waktu ke waktu. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya enkapsulasi menyebabkan melarutnya bahan aktif menjadi lebih perlahan, sehingga akan mempengaruhi penurunan tekanan darahnya. Penurunan tekanan darah digambarkan juga pada penelitian yang dilakukan oleh Edwards *et al.* (2007) bahwa kuersetin dapat mengurangi tekanan darah pada subjek yang mengalami hipertensi. Penelitian lain yang dilakukan oleh Duarte *et al.* (1993) menunjukkan bahwa kuersetin dapat menurunkan tekanan darah pada tikus hipertensi spontan, sedangkan ekstrak murbei juga mengandung kuersetin. Sehingga dapat dimengerti bahwa ekstrak daun murbei dapat menurunkan tekanan darah arteri.

Frekuensi denyut jantung karena pemberian ekstrak dan ekstrak terenkapsulasi pada tikus normotensif dapat dilihat pada gambar 6.

Frekuensi denyut jantung karena ekstrak maupun ekstrak terenkapsulasi pada tikus normotensif menunjukkan penurunan setelah 3 jam pemberian per oral. Penurunan frekuensi denyut jantung pada pemberian ekstrak sebesar 6,28 %, sedangkan pada pemberian ekstrak terenkapsulasi menunjukkan penurunan frekuensi denyut jantung sebesar 19,25 % pada tikus normotensif. Hal ini disebabkan karena didalam ekstrak daun murbei mengandung Mn yang dapat berfungsi sebagai kalsium antagonis, sehingga menghambat masuknya ion kalsium ke dalam sel (Braunwald, 1982). Hal ini akan mempengaruhi potensial yang terjadi pada NSA (*Nodus Sino Auricularis*) sebagai pacu jantung, sehingga menyebabkan frekuensi denyut jantung menurun. Pada penelitian ini diketahui ekstrak daun murbei juga mengandung Mn sebesar  $(0,77 \pm 0,10)$  ppm. Dengan demikian dapat dimengerti bahwa frekuensi denyut jantung mengalami penurunan.

Frekuensi denyut jantung karena pemberian ekstrak dan ekstrak terenkapsulasi pada tikus hipertensif (gambar 7).

Hasil penentuan frekuensi denyut jantung terlihat meningkat setelah 2 jam pemberian ekstrak maupun ekstrak terenkapsulasi pada hewan coba hipertensif. Peningkatan frekuensi denyut jantung pada pemberian ekstrak sebesar 14,33 %, sedangkan pada pemberian ekstrak terenkapsulasi menunjukkan peningkatan frekuensi denyut jantung sebesar 2,90 % pada tikus hipertensif, namun penurunan tekanan darah tetap terjadi. Hal ini mungkin disebabkan karena pengaruh vasodilatasi pembuluh darah masih lebih kuat dari pada pengaruh frekuensi denyut jantung didalam menurunkan tekanan

darah. Seperti diketahui pada penelitian terdahulu bahwa kuersetin memiliki sifat penting sebagai vasorelaksan pada pembuluh darah arteri terisolasi (Duarte *et al.*, 1993).

Penurunan tekanan darah arteri pada tikus mulai terjadi setelah 0,5 jam baik pada pemberian ekstrak maupun ekstrak terenkapsulasi. Penurunan tekanan darah yang terjadi tersebut mungkin disebabkan karena adanya rutin dan kuersetin yang terdapat didalam ekstrak maupun ekstrak terenkapsulasi. Rutin dan kuersetin merupakan flavonoid yang dapat berefek menurunkan tekanan darah (Paris *et al.*, 1977).

## KESIMPULAN

Ekstrak daun murbei dapat menurunkan tekanan darah arteri sebesar 22,45 % dan ekstrak daun murbei terenkapsulasi dapat menurunkan tekanan darah sebesar 4,93 % pada tikus hipertensif spontan. Ekstrak daun murbei dan ekstrak daun murbei terenkapsulasi dapat meningkatkan frekuensi denyut jantung pada tikus hipertensif spontan berturut-turut 14,33 % dan 2,90 %.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan fasilitas berupa dana penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, M., Akter, Mst.S., Lee, J-C., Eun, J-B., 2010, Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato, *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1307 - 1312.
- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, 4 - 16, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Aminah, S., Suwaldi, Fudholi, A., Wahyono, 2014, Enkapsulasi Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba* L.) untuk Peningkatan Absorpsi *In-Vitro* Kandungan Rutin, *JFI*, 7,2, 105 - 110.
- Braunwald, E., 1982, Mechanism of Action of Calcium-Channel-Blocking Agents, *N. Engl. J. Med.* 307 (28), 1618 - 1627.
- Dalimartha, S., Abidin, M.A.C.M.M., dan Winarno R., 1999, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, jilid 1 Cetakan 1, 90 - 96, Trubus Agriwidya, Jakarta.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, and Tamargo J., 1993, Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, 239, 1-7.

- Höcht, C., Verniero, C.D., Opezzo, J.A.W., Bramuglia, G.F., Taira, C.A., 2006, Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling of cardiovascular effects of metoprolol in spontaneously hypertensive rats: a microdialysis study, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 373, 310 – 318.
- Edwards, R.L., Lyon, T., Litwin, S.E., Rabovsky, A. and Symons, J.D. , 2007, Quercetin Reduces Blood Pressure in Hypertensive Subjects, *J.Nutr.*, 137, 2405 – 2411.
- Keele, C.A., Neil, E., Joels, N., 1982, *Samson Wright's Applied Physiology*, 13<sup>th</sup> Ed., 65 – 152, Oxford University Press, New York.
- Lamina, B., Chemla, D., Richard, C., and Teboul, J-L., 2005, Clinical review : Interpretation of arterial pressure wave in shock states, *Clinical Care*, 9 (6), 601 – 606.
- Munin, A., and Edwards-Lévy, F., 2011, Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds ; a Review, *Pharmaceutics*, 3, 793 - 829.
- Nie, K., Tang, Z., Wu, X., Xu, X., Liang, Y., Li, H. and Rao, L., 2012, Optimization of total flavonoids extraction from mulberry leaf using an ethanol-based solvent system, *J. Med. Plants Res.*, 6 (12), 2373 – 2380.
- Perry, L.M., 1980, *Medicinal Plants of East and South-east Asia*, The MIT Press, London
- Paris, R., Plat, M., Giono-Barber, P., Linhard, J., Lawrence, A., 1977, Recherche Clinique et pharmacologique Sur les fruits d'*Anacardium occidentale* L., *Soc. Med. Afr. Novu Lang, Franc*, 22(3), 275 - 281.
- Rushmer, R.F., 1976, *Structure and Function of the Cardiovascular System*, 2<sup>nd</sup> Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Sinko, P.J., 2006, *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5<sup>th</sup> Ed., 21-58, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G., 1980, *Statistical Methods*, 7<sup>th</sup> Ed., 365 - 392, The Iowa State University Press, IOWA.
- Stoica, R., Somoghi, R. and Ion, R.M., 2013, Preparation of chitosan tripolyphosphate nanoparticles for the encapsulation of polyphenols extracted from rose hips, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8, 955-963.
- Stojanovic, R., Belscak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., Bugarski, B., 2012, Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads, *J. Sci. Food Agric.*, 92, 685–696.
- Wang, J., Wu, F.A., Zhao, H., Liu, L., Wu, Q.S., 2008, Isolation of flavonoids -from mulberry (*Morus alba* L.), *African Journal of Biotechnology*, 7(13) 2147-2155.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999, The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 64, 555 – 559