

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 AKTIF PADA
NEURON PURKINJE CEREBELLUM TIKUS YANG DIINDUKSI
SODIUM NITRIT**

Karya Tulis Ilmiah

Untuk Memenuhi Sebagian Syarat

Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran

Program Studi Pendidikan Dokter



oleh:

Asri Ayuning Kusuma

13711076

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA**

2017

**THE EFFECT OF GOTU KOLA (*Centella asiatica*) LEAVES ETHANOL
EXTRACT ON ACTIVE CASPASE-3 EXPRESSION IN RATS
CEREBELLAR PURKINJE NEURONS INDUCED BY SODIUM NITRITE**

A Scientific Paper

Submitted as Fulfillment

to Obtain the Medical Degree

Medical Education Program



by:

Asri Ayuning Kusuma

13711076

**FACULTY OF MEDICINE
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA**

2017

LEMBAR PENGESAHAN
PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN
PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI
CASPASE-3 AKTIF PADA NEURON PURKINJE
CEREBELLUM TIKUS YANG DIINDUKSI SODIUM NITRIT

Disusun dan diajukan oleh :

Asri Ayuning Kusuma

13711076

Telah diseminarkan tanggal : 03 Maret 2017

dan telah disetujui oleh :

Penguji



dr. Ety Sari Handayani, M.Kes

Pembimbing Utama



dr. Kuswati, M.Sc

Ketua Prodi Pendidikan Dokter



dr. Erlina Marfianti, M.Sc, Sp. PD.

Disahkan

Dekan



Linda Rosita, M.Kes, Sp. PK

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*)
TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 AKTIF PADA NEURON PURKINJE
CEREBELLUM TIKUS YANG DIINDUKSI SODIUM NITRIT**

ASRI AYUNING KUSUMA¹, KUSWATI², ETY SARI HANDAYANI²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

²Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

INTISARI

Latar Belakang : Sodium nitrit banyak digunakan sebagai pengawet makanan. Penggunaan sodium nitrit secara berlebihan akan memberikan dampak berupa hipoksia dan stres oksidatif. Neuron purkinje cerebellum sangat sensitif terhadap kondisi stres oksidatif, sehingga perlu agen neuroprotektif untuk mencegah kematian sel yang ditandai dengan ekspresi caspase-3 aktif pada neuron purkinje cerebellum. Pegagan (*Centella asiatica*) memiliki banyak manfaat, diantaranya, sebagai antioksidan dan neuroprotektif.

Tujuan Penelitian : Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun pegagan terhadap ekspresi caspase-3 aktif pada neuron purkinje cerebellum tikus yang diinduksi sodium nitrit.

Metode Penelitian : Penelitian eksperimental ini menggunakan rancangan *post-test control group* dengan sampel berupa 15 bahan biologi tersimpan yang dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok Kontrol, Perlakuan 1 (diinduksi sodium nitrit), dan Perlakuan 2 (diinduksi sodium nitrit kemudian diberi ekstrak ethanol daun pegagan). Ekspresi caspase-3 aktif dinilai menggunakan skor Allred. Hasil pengamatan dianalisis menggunakan uji *one way anova*.

Hasil : Terdapat perbedaan ekspresi caspase-3 aktif yang signifikan pada neuron purkinje cerebellum antara kelompok Kontrol, Perlakuan 1, dan Perlakuan 2 ($p=0,000$). Kelompok Perlakuan 2 memiliki ekspresi caspase-3 aktif yang lebih rendah daripada kelompok Perlakuan 1 ($p=0,000$).

Kesimpulan : Ekstrak ethanol daun pegagan dapat menurunkan ekspresi caspase-3 aktif pada neuron purkinje cerebellum tikus yang diinduksi sodium nitrit.

Kata Kunci : *Centella asiatica*, Caspase-3, Neuron Purkinje, Sodium Nitrit.

ABSTRACT

Background : Sodium nitrite is widely used as a food preservative. High consumption of sodium nitrite could cause hypoxia and oxidative stress. Cerebellar purkinje neurons is highly sensitive to oxidative stress therefore neuroprotective agent is required to prevent cell death marked by caspase-3 expression in rats cerebellar purkinje neurons. Gotu kola (*Centella asiatica*) has many benefits including as an antioxidant and neuroprotective.

Objective : This research aimed to know the effect of Gotu kola leaves ethanol extract on active caspase-3 expression in rats cerebellar purkinje neurons induced by sodium nitrite.

Methods : This was an experimental research with post-test control group design using 15 stored biological materials as a sample which is divided into three groups, control group, treatment 1 (given sodium nitrite), and treatment 2 (given sodium nitrite then Gotu kola leaves ethanol extract). The expression of active caspase-3 was assessed using Allred score. Observation results were analyzed by one way ANOVA test.

Results : There was a significant difference of active caspase-3 expression between control, treatment 1, and treatment 2 groups ($p=0,000$). The treatment 2 groups gave a lower active caspase-3 expression in rats cerebellar purkinje neurons compared to treatment 2 groups ($p=0,000$).

Conclusion : The Gotu kola leaves ethanol extract lower the active caspase-3 expression in rats cerebellar purkinje neurons induced by sodium nitrite.

Keywords: *Centella asiatica*, Caspase-3, Purkinje Neurons, Sodium Nitrite

PENDAHULUAN

Sodium nitrit (NaNO_2) adalah bahan pengawet daging dan ikan yang bekerja dengan cara menghambat pertumbuhan spora *Clostridium botulinum* di dalam lemari pendingin¹.

Efek samping penggunaan sodim nitrit berlebihan yaitu hipoksia jaringan melalui mekanisme perubahan hemoglobin (Hb) menjadi methemoglobin (MetHb) yang memiliki daya ikat rendah terhadap oksigen. Hipoksia yang terjadi dapat mengakibatkan stres oksidatif dan memicu peningkatan produksi *reactive oxygen/nitrogen species* (ROS/NOS). Apabila hipoksia berlangsung

terus-menerus maka dapat menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik yang diawali dengan kebocoran membran luar mitokondria kemudian menyebabkan lepasnya dua protein proapoptosis (sitokrom-c dan HtrA2/Omi) ke sitosol. Hal itu dapat mengaktifkan enzim proapoptosis caspase-9 sebagai caspase inisiator apoptosis dan caspase-3 sebagai caspase eksekutor apoptosis. Oleh karena itu, adanya ekspresi caspase-3 aktif dapat dijadikan penanda terjadinya apoptosis sel^{2,3}.

Cerebellum berfungsi sebagai pengendali gerakan motorik tubuh. Fungsi

cerebellum sangat dipengaruhi oleh neuron purkinje cerebellum, akan tetapi neuron ini sangat sensitif terhadap kondisi yang memicu stres oksidatif seperti iskemia^{4,5}.

Pegagan (*Centella asiatica*) berasal dari famili *Umbelliferae* yang banyak terdapat di daerah iklim tropis⁶. Tanaman rambat ini telah digunakan selama berabad-abad dalam pengobatan untuk penyakit-penyakit seperti penyakit kejiwaan, lepra, ulkus, asma, ekzema, dan penyembuhan luka⁷. Pegagan mengandung bahan aktif berupa triterpene dan derivatnya (*asiatic acid*, *asiaticoside*, *flavonoid*, dan *volatile oil*)⁶. Bahan-bahan aktif dalam pegagan berperan dalam penyembuhan luka dengan efek antimikroba, antiinflamasi, antioksidan, dan imunostimulan⁶.

Penelitian lain terkait zat aktif *Centella asiatica*, didapatkan hasil bahwa *asiatic acid* yang terkandung dalam *Centella asiatica* mampu memberikan efek neuroprotektif pada sel hipokampus yang mengalami stres oksidatif⁸. Penelitian lain membuktikan bahwa *Centella asiatica* berperan dalam mengaktifkan gen perespon antioksidan serta mampu memberi efek neuroprotektif terhadap toksisitas β -*amyloid*⁹. *Centella asiatica* juga mampu memberikan efek neuroprotektif terhadap kerusakan sel saraf akibat stres oksidatif terkait penuaan¹⁰. Pada penelitian terkait pengaruh ekstrak ethanol *Centella asiatica* terhadap jumlah sel purkinje cerebellum tikus yang diinduksi natrium nitrit didapatkan hasil bahwa ekstrak ethanol *Centella asiatica* dapat mencegah kematian sel purkinje¹¹. Pada penelitian terkait pengaruh ekstrak ethanol *Centella asiatica* terhadap ekspresi bax pada neuron purkinje cerebellum tikus yang

diinduksi natrium nitrit didapatkan hasil bahwa ekstrak ethanol *Centella asiatica* dapat menurunkan ekspresi bax¹². Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi caspase-3 aktif pada cerebellum tikus yang diinduksi sodium nitrit.

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental ini menggunakan rancangan penelitian *post-test control group* untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi caspase-3 aktif pada neuron purkinje cerebellum tikus yang diinduksi sodium nitrit.

Sampel penelitian merupakan bahan biologis tersimpan dari jaringan otak tikus yang berasal dari tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol atau tanpa perlakuan (K), kelompok perlakuan pertama (P1) dengan pemberian NaNO₂ dosis 50 mg/KgBB/hari selama 42 hari, dan kelompok perlakuan kedua (P2) dengan pemberian NaNO₂ dosis 50 mg/Kg BB/hari kemudian diberi ekstrak ethanol daun pegagan dosis 300 mg/KgBB/hari selama 42 hari.

Bahan biologis tersimpan tersebut berupa blok parafin yang kemudian dibuat preparat dengan cara disayat setebal 5 μ m menggunakan *rotary microtome* lalu dilakukan pewarnaan IHC (imunohistokimia) dengan *antibody anticaspase-3*. Preparat akan diamati dengan perbesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX21* dengan kamera

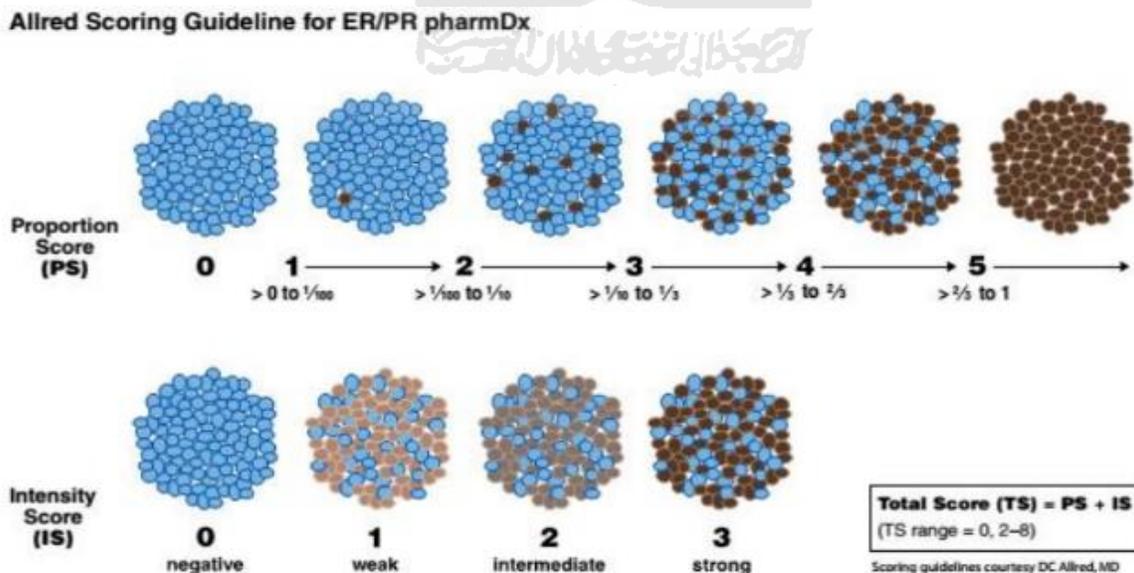
optilab yang terhubung pada komputer dengan *software optilab viewer* untuk merekam gambar dengan pencitraan 640x480.

Ekspresi caspase-3 aktif ditandai dengan sitoplasma sel yang berwarna kecoklatan dan penilaian dilakukan menggunakan skor Allred yang mempertimbangkan proporsi sel positif dalam skala 0 – 5 dan intensitas warna dalam skala 0 – 3¹³. Hasil penilaian dari dua parameter tersebut akan dijumlahkan, sehingga didapatkan hasil 0 atau 2 – 8¹³. Apabila hasil penjumlahan 0 – 2 maka diinterpretasikan negatif (tidak ada ekspresi caspase-3 aktif)¹³. Namun, jika hasil penjumlahan 3-8 maka diinterpretasikan positif (ada ekspresi caspase-3 aktif)¹³.

Perbedaan ekspresi caspase-3 aktif pada ketiga kelompok diuji dengan *Analyze of Varian* (ANOVA), kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang menunjukkan perbedaan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang didapatkan yakni pada kelompok Kontrol (gambar 2A) yang tidak diberi perlakuan, tetap dapat ditemukan neuron purkinje cerebellum yang sitoplasmanya mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan dengan intensitas warna sedang dan proporsi sel yang tidak terlalu banyak saat dinilai menggunakan skor Allred. Hal ini menandakan bahwa pada kelompok Kontrol terjadi kematian neuron purkinje cerebellum dalam jumlah relatif sedikit, ditunjukkan dengan perolehan skor Allred yang cukup rendah (Tabel 1). Pada kelompok Perlakuan 1 (gambar 2B) yang diberi NaNO₂ dosis 50 mg/KgBB/hari, ditemukan neuron purkinje cerebellum yang sitoplasmanya mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan dengan intensitas warna kuat dan proporsi sel yang banyak saat dinilai menggunakan skor Allred. Hasil pada kelompok Perlakuan 1 ini, menandakan bahwa neuron purkinje cerebellum

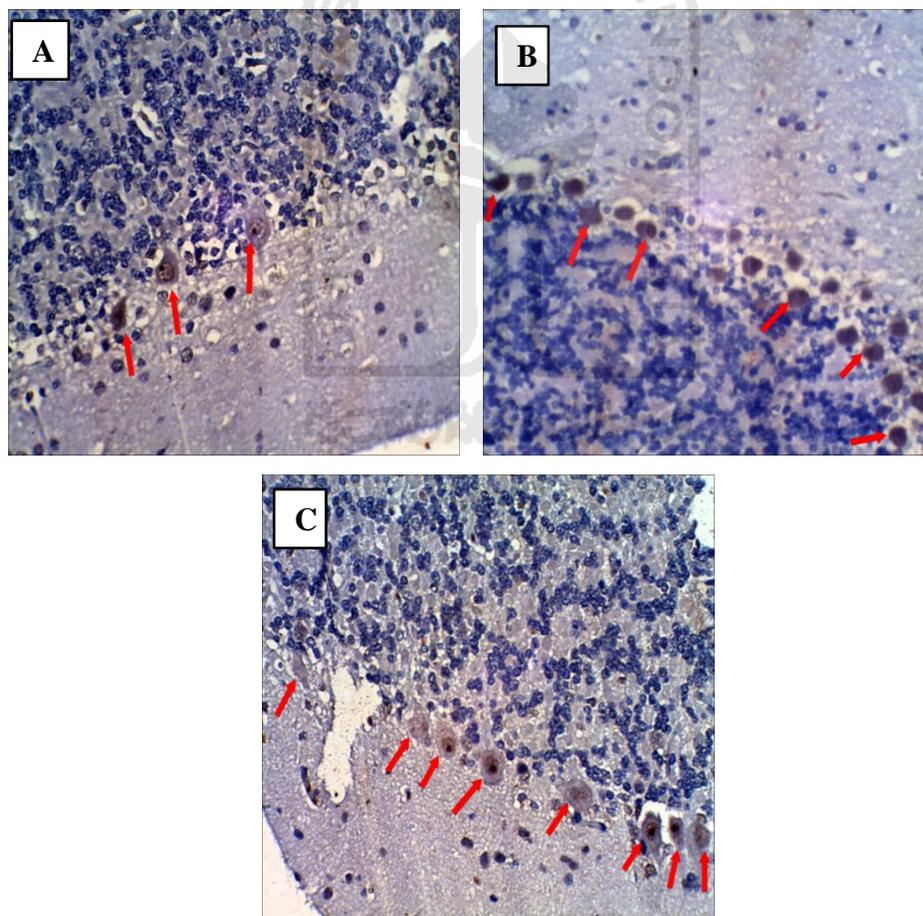


Gambar 1. Skor Allred¹³

mengalami kematian sel dalam jumlah besar, yang ditunjukkan melalui tingginya perolehan skor Allred (Tabel 1). Pada kelompok Perlakuan 2 (gambar 2C) yang diberi NaNO_2 dosis 50 mg/KgBB/hari dan ekstrak ethanol daun pegagan dosis 300 mg/KgBB/hari, ditemukan neuron purkinje cerebellum yang sitoplasmanya mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan dengan intensitas warna sedang dan proporsi sel yang tidak terlalu banyak saat dinilai menggunakan skor Allred. Hasil ini menandakan bahwa pada kelompok Perlakuan 2 terjadi kematian neuron purkinje cerebellum dalam jumlah sedang,

ditunjukkan dengan skor Allred yang lebih tinggi dari kelompok Kontrol namun lebih rendah dari kelompok Perlakuan 1 (Tabel 1).

Hasil pengamatan ekspresi caspase-3 aktif pada neuron purkinje cerebellum kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), dan Perlakuan 2 (P2) dianalisis menggunakan uji *one way anova*. Sebelum dilakukan uji *one way anova* dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas data menggunakan uji *levene*. Pada uji *Shapiro-Wilk* ($p_k=0,911$; $p_{p1}=0,754$; $p_{p2}=0,135$) dan *levene* ($p=0,929$) didapatkan hasil *p-value* > 0,05, artinya subjek berasal dari populasi



Gambar 2. Gambaran Ekspresi Caspase-3 Aktif Pada Neuron Purkinje Cerebellum Tikus (A) Kelompok Kontrol. (B) Kelompok Perlakuan 1. (C) Kelompok Perlakuan 2.

Tabel 1. Hasil Analisa Deskriptif Skor Allred

Kelompok	Rerata Skor Allred	Mean	SD	One Way Anova
Kontrol	4,42 ± 0,25	4,42	0,25	
Perlakuan 1	5,66 ± 0,20	5,66	0,20	0,000
Perlakuan 2	4,66 ± 0,21	4,66	0,21	

Tabel 2. Hasil Analisa Perbandingan Setiap Kelompok Menggunakan *Post-Hoc Test*

Kelompok	Kontrol	Perlakuan 1	Perlakuan 2
Kontrol		0,000	0,146
Perlakuan 1	0,000		0,000
Perlakuan 2	0,146	0,000	

yang berdistribusi normal dan homogen.

Pada hasil analisis data, didapatkan skor Allred kelompok Kontrol memiliki rerata nilai minimum 4,10, rerata nilai maksimum 4,70, mean 4,42 (SD=0,25) (Tabel 1). Pada kelompok Perlakuan 1, didapatkan skor Allred dengan nilai minimum 5,40, nilai maksimum 5,90, mean 5,66 (SD=0,20) (Tabel 1). Pada kelompok Perlakuan 2, skor Allred memiliki rerata nilai minimum 4,30, rerata nilai maksimum 4,90, mean 4,66 (SD=0,21) (Tabel 1).

Hasil yang didapatkan pada uji *one way anova* dengan menggunakan $\alpha = 95\%$ terhadap kelompok Kontrol, Perlakuan 1, dan Perlakuan 2 adalah *p-value* 0,000 (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi caspase-3 aktif (skor Allred) yang bermakna pada minimal dua kelompok dari tiga kelompok penelitian. Setelah dilakukan uji *one way anova* dilakukan uji *post-hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki

perbedaan ekspresi caspase-3 aktif (skor Allred) bermakna.

Pada uji *post-hoc* didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan ekspresi caspase-3 aktif (skor Allred) yang bermakna antara kelompok Kontrol yang tidak diberi perlakuan dengan kelompok Perlakuan 1 yang diberi NaNO₂ dosis 50 mg/KgBB/hari, ditunjukkan dengan *p-value* < 0,05 (*p*=0,000) (Tabel 2). Hal ini membuktikan bahwa sodium nitrit (NaNO₂) yang diinduksikan ke dalam tubuh tikus memiliki pengaruh yang bermakna untuk menimbulkan kematian neuron purkinje cerebellum.

Sodium nitrit dapat menyebabkan kerusakan sel karena zat ini dapat memicu hipoksia jaringan maupun organ melalui mekanisme oksidasi Fe²⁺ yang berikatan dengan hemoglobin. Sodium nitrit yang beredar di dalam darah akan menyebabkan ikatan Fe²⁺ dengan hemoglobin teroksidasi, sehingga Fe²⁺ berubah menjadi Fe³⁺ dan hemoglobin yang pada awalnya berikatan

dengan Fe^{2+} jadi berikatan dengan Fe^{3+} . Bentuk hemoglobin yang telah berikatan dengan Fe^{3+} ini disebut methemoglobin (MetHb). Berbeda dengan hemoglobin yang bekerja dengan baik dalam mengikat oksigen di dalam darah, maka bentuk methemoglobin ini memiliki daya ikat oksigen yang sangat rendah, sehingga oksigen di dalam darah tidak dapat disalurkan ke seluruh tubuh dan mengakibatkan hipoksia pada jaringan maupun organ. Apabila hipoksia terjadi terus-menerus, maka kadar protein Bcl-2 yang berfungsi mempertahankan permeabilitas membran luar mitokondria akan menurun dan menyebabkan terjadinya kebocoran membran. Kebocoran membran luar mitokondria akan membuat sitokrom-c masuk ke dalam sitosol dan terjadi apoptosis^{2,3,14,15}.

Penelitian serupa yang menunjukkan pengaruh sodium nitrit dalam menimbulkan kematian neuron purkinje cerebellum didapatkan hasil bahwa induksi sodium nitrit dengan dosis 75 mg/KgBB secara subkutan dapat menimbulkan autolisis pada hampir semua neuron purkinje cerebellum dalam jangka waktu satu jam⁵. Penelitian tersebut juga mengemukakan bahwa neuron purkinje memiliki peranan penting bagi cerebellum untuk berfungsi secara normal, akan tetapi neuron ini sangat sensitif terhadap kondisi yang memicu stres oksidatif seperti iskemia⁵. Oleh karena itu, jika terjadi hipoksia yang menyebabkan iskemia maka aktivitas elektrik pada cerebellum akan menghilang⁵. Penelitian lain mengemukakan bahwa induksi natrium nitrit dengan dosis 50 mg/KgBB/hari selama 42 hari secara signifikan dapat menyebabkan penurunan

jumlah sel purkinje cerebellum karena terjadi hipoksia neuron purkinje¹¹. Penelitian lain juga membuktikan bahwa induksi natrium nitrit 50 mg/KgBB/hari pada *Rattus novergicus* selama 42 hari secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi bax pada neuron purkinje cerebellum¹². Hal ini membuktikan induksi natrium nitrit dapat menimbulkan kematian neuron purkinje cerebellum¹². Induksi sodium nitrit dengan dosis 150 mg/KgBB dapat meningkatkan konsentrasi methemoglobin mencapai kadar maksimum (45% - 80%) di darah dalam jangka waktu satu jam dan waktu paruh nitrit di dalam tubuh yaitu sekitar 70 menit, sehingga dapat terjadi methemoglobinemia berat yang menyebabkan hipoksia dan kematian¹⁴. Penelitian lain menemukan bahwa induksi sodium nitrit dengan dosis 50 mg/KgBB dan waktu yang bervariasi yaitu selama 1 jam, 5 jam, dan 48 jam secara bermakna dapat menurunkan jumlah sel sperma tikus akibat hipoksia³. Penelitian lain menemukan bahwa sodium nitrit dapat menyebabkan stres oksidatif sel hepar, dibuktikan dengan induksi sodium nitrit dosis 80 mg/KgBB/hari selama 12 minggu secara bermakna menyebabkan peningkatan kadar serum ALT (*alanine aminotransferase*) dan ALP (*alkaline phosphatase*), serta peningkatan aktivitas GGT (*gamma glutamyltransferase*) dan konsentrasi bilirubin¹.

Uji *post-hoc* yang dilakukan pada penelitian ini juga ditemukan perbedaan ekspresi caspase-3 aktif (skor Allred) yang bermakna antara kelompok Perlakuan 1 yang diberi $NaNO_2$ dosis 50 mg/KgBB/hari dengan kelompok Perlakuan 2 yang diberi $NaNO_2$ dosis 50 mg/KgBB/hari dan ekstrak

ethanol daun pegagan dosis 300 mg/KgBB/hari, ditunjukkan dengan *p-value* < 0,05 ($p=0,000$) (Tabel 2). Hal ini membuktikan bahwa ekstrak ethanol daun pegagan memiliki pengaruh yang bermakna dalam mencegah kematian neuron purkinje cerebellum akibat stres oksidatif yang ditimbulkan oleh methemoglobinemia atau tingginya kadar methemoglobin dalam darah. Hasil analisis uji *post-hoc* juga menunjukkan bahwa antara kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan 2 terdapat perbedaan ekspresi caspase-3 aktif (skor Allred) yang tidak bermakna dibuktikan dengan *p-value* > 0,05 ($p=0,146$) (Tabel 2). Hasil yang tidak bermakna ini memperkuat pembuktian bahwa ekstrak ethanol daun pegagan dapat mencegah kematian neuron purkinje cerebellum akibat induksi sodium nitrit sehingga hasil pada kelompok Perlakuan 2 tidak terlalu berbeda dengan kelompok Kontrol yang tidak diberi perlakuan.

Daun pegagan (*Centella asiatica*) mengandung berbagai macam senyawa aktif yang memiliki sifat antioksidan. Senyawa aktif utama yang terkandung dalam pegagan yaitu *triterpene saponosides* beserta derivatnya dan *flavonoid* beserta derivatnya¹⁶. Penggunaan ekstrak daun pegagan dapat mengurangi stres oksidatif dan disfungsi mitokondria secara bermakna melalui mekanisme reduksi ROS (*radical oxygen species*) dan MDA (*Malondialdehyde*)¹⁶. Derivat *triterpene saponosides* dalam ekstrak daun pegagan berperan dalam proses memori dan belajar serta mampu menghambat aktivitas enzim asetilkolinesterase (enzim penghidrolisis asetilkolin yang berperan dalam patogenesis

penyakit alzheimer), sedangkan *flavonoid* dalam pegagan memiliki peran dalam pencegahan terjadinya neurotoksik¹⁶. Neurotoksik dapat dicegah oleh pegagan melalui mekanisme antioksidan pada tikus yang induksi iskemia cerebral permanen¹⁶.

Berdasarkan penelitian lain, didapatkan bahwa penggunaan ekstrak pegagan dengan dosis 300 mg/KgBB/hari selama 60 hari dapat mencegah stres oksidatif terkait penambahan usia dan efektif dalam menurunkan kadar peroksidasi lipid dan karbonil protein¹⁰. Penurunan kadar peroksidasi lipid terjadi melalui penghambatan *xantin oxidase* dan *lipooxygenase kinase*, sehingga mengakibatkan penurunan ROS¹⁰. Penurunan kadar peroksidasi lipid dapat mencegah terjadinya kerusakan sel¹⁰.

Pada penelitian lain ditemukan bahwa senyawa aktif dalam pegagan (*madecassol*) dapat membantu meningkatkan proses proliferasi sel, sintesis kolagen, angiogenesis serta epitelisasi pada tempat yang luka¹⁷. Senyawa aktif lain dalam pegagan (*asiaticoside*) dapat memicu aktivitas antioksidan saat fase inisiasi penyembuhan luka¹⁷. Selain itu, ekstrak pegagan juga dapat melindungi neuron dari kerusakan oksidatif dan mampu mempercepat perbaikan neuron yang rusak dengan memicu pemanjangan neurit¹⁷.

Penelitian serupa yang menunjukkan pengaruh ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) dalam mencegah kematian sel purkinje membuktikan bahwa penggunaan ekstrak ethanol daun pegagan berdosisi 600 mg/KgBB/hari selama 42 hari secara signifikan dapat mencegah kematian sel purkinje cerebellum karena hipoksia

akibat sodium nitrit¹¹. Penelitian lain membuktikan bahwa pemberian ekstrak ethanol daun pegagan dosis 600 mg/KgBB/hari pada *Rattus novergicus* selama 42 hari secara signifikan dapat menurunkan ekspresi bax pada neuron purkinje cerebellum¹². Hal ini membuktikan bahwa penggunaan ekstrak ethanol daun pegagan secara signifikan dapat mencegah kematian neuron purkinje cerebellum. Pada penelitian lain didapatkan hasil bahwa pemberian ekstrak ethanol daun pegagan dengan dosis 300 mg/KgBB/hari selama 21 hari secara signifikan dapat mencegah kematian sel neuron di korteks prefrontalis tikus akibat stres restrain, yaitu induksi stres dengan cara memasukkan tikus ke dalam tabung (panjang = 15 cm dan diameter 5,5 cm) yang diberi lubang (diameter = 3 mm) selama 6 jam/hari¹⁸.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penghitungan skor Allred yang menggambarkan ekspresi caspase-3 aktif pada sediaan biologis tersimpan kelompok Kontrol, Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 dengan tujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi caspase-3 aktif pada neuron purkinje cerebellum tikus yang diinduksi sodium nitrit, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang bermakna pada pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) dalam menurunkan ekspresi caspase-3 aktif pada neuron purkinje cerebellum tikus yang diinduksi sodium nitrit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sherif, I.O., Al-Gayyar, M.M.H., 2013. Antioxidant, Anti-Inflammatory And Hepatoprotective Effects Of Silymarin On Hepatic Dysfunction Induced By Sodium Nitrite, *European cytokine network*, 24(3), 114–21.
2. Hidayat, A., Wiradisastra, K., Hernowo, B.S., Achmad, T. H., 2011. Ekspresi Bcl-2 dan Caspase-3 Pascapaparan Hipoksia Hipobarik Intermiten, *MKB*. 43:4, 166-170.
3. Pavlova, E., Dimova, D., Petrova, E., Gluhcheva, Y., Atanassova, N., 2012. Rat Sperm Count Changes at Early Stages After Hemic Hypoxia, *Journal BioScience*, 73–76.
4. Snell, R., 2010. *Clinical Neuroanatomy* (7th ed). Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.
5. Zaidi, Z.F., 2010. Effects of Natrium Nitrite-Induced Hypoxia on Cerebellar Purkinje Cells in Adult Rats, *Pak J Med Sci*, Vol. 26, No : 2, 261-266.
6. Kedzia, B., Kozłowska, T.B., Furmanowa, M., Mikolajczak, P., Kedzia, E.H., Kozaryn, I.O., *et al.*, 2007. Studies on the Biological Properties of Extracts from *Centella asiatica* (L.) Urban Herb, *Herba Polonica*, 53:1, 34-44.
7. Rai, N., Agrawal, R.C., Khan, A., 2011. Chemopreventive Potential of *Centella asiatica* on B6F10 Melanoma Cell Lines in Experimental Mice, *Pharmacologyonline 1*, 748-758.
8. Xu, M.F., Xiong, Y.Y., Liu, J.K., Qian J.J., Zhu, L., Gao, J., 2012. Asiatic Acid, A Pentacyclic Triterpene in

- Centella asiatica*, Attenuates Glutamate-Induced Cognitive Deficits in Mice and Apoptosis in SH-SY5Y Cells, *Acta Pharmacologica Sinica*, 33, 578-587.
9. Gray, N.E., Sampath, H., Zweig, J.A., Quinn, J.F., Soumyanath, A., 2015. *Centella asiatica* Attenuates β -amyloid-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction, *J Alzheimers Dis*, 45:3, 933–946.
 10. Subathra, M., Shila, S., Devi, M.A., Panneerselvam, C., 2005. Emerging Role of *Centella asiatica* in Improving Age-Related Neurological Antioxidant Status, *Experimental Gerontology*, 40, 707-715.
 11. Anda, P.T., 2015, Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Jumlah Sel Purkinje Serebelum Tikus (*Rattus novergicus*) Yang Diinduksi Natrium Nitrit Sub Akut, *Skripsi*, Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia.
 12. Priambodo, R.D., 2016, Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi Bax Pada Neuron Purkinje Cerebellum Tikus (*Rattus novergicus*) Yang Diinduksi Natrium Nitrit Sub Akut, *Skripsi*, Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia.
 13. Allred, D.C., 2005. Assessment of Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer by Immunohistochemistry, *Connection*, 9, 4-5.
 14. Chan, P.C., *et al.*, 2001. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Sodium Nitrite, *National Toxicology*, 01-3954.
 15. Gehle, K., 2013. *ATSDR Case Studies in Environmental Medicine Nitrate/Nitrite Toxicity*. Amerika: U.S. Department of Health and Human Service.
 16. Orhan, I.E., 2012. *Centella asiatica* (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-8.
 17. Joshi, K., Chaturvedi, P., 2013. Therapeutic Efficiency of *Centella asiatica* (L.) Urb. An Underutilized Green Leafy Vegetable: an Overview, *International Journal of Pharmaco Bio Science*, 4:1, 135-49.
 18. Priyantiningrum, A.K., Kuswati, Handayani, E.S., 2015. Pengaruh Ekstrak Etanol *Centella asiatica* Terhadap Jumlah Sel Neuron Di Korteks Prefrontalis Tikus Yang Diberi Perlakuan Stres, *JKKI*, Vol. 6, No. 4, 198-207.