

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 AKTIF PADA
LAPISAN MOLEKULER DAN GRANULER GYRUS DENTATUS TIKUS
YANG DIINDUKSI SODIUM NITRIT SUB AKUT**

Karya Tulis Ilmiah

Untuk Memenuhi Sebagian Syarat

Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran

Program Studi Pendidikan Dokter



oleh:

Ninda Ariesta

13711110

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA**

2016

THE EFFECT OF GOTU KOLA (*Centella asiatica*) LEAF ETHANOL EXTRACT AGAINST ACTIVE CASPASE-3 EXPRESSION ON RATS MOLECULAR AND GRANULAR LAYER OF DENTATE GYRUS NEURON INDUCED BY SUB ACUTE SODIUM NITRITE

A Scientific Paper

Submitted as Fulfillment
to Obtain the Medical Degree

Medical Education Program



by:

Ninda Ariesta

13711110

**FACULTY OF MEDICINE
ISLAMIC UNIVERSITY OF INDONESIA
YOGYAKARTA**

2016

KARYA TULIS ILMIAH

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN
PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI
CASPASE-3 AKTIF PADA LAPISAN MOLEKULER DAN
GRANULER GYRUS DENTATUS TIKUS YANG DIINDUKSI
SODIUM NITRIT SUB AKUT**

Disusun dan diajukan oleh:

Ninda Ariesta

13711110

Telah diseminarkan tanggal : 16 Juni 2016

Dan telah disetujui oleh :

Penguji



dr. Ety Sari Handayani, M.Kes

Pembimbing



dr. Kuswati, M.Sc

Ketua Prodi Pendidikan Dokter



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

Disahkan

Dekan



dr. Linda Rosita, M.Kes., Sp. PK.

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 AKTIF PADA LAPISAN MOLEKULER DAN GRANULER GYRUS DENTATUS TIKUS YANG DIINDUKSI SODIUM NITRIT SUB AKUT

Ninda Ariesta, Kuswati, Ety Sari Handayani

INTISARI

Latar Belakang : Sodium nitrit merupakan salah satu bahan pengawet makanan yang biasanya terkandung dalam makanan olahan. Sodium nitrit dalam dosis tinggi dapat mengakibatkan hipoksia jaringan. Keadaan hipoksia berakibat kerusakan sel dan memicu terjadinya apoptosis yang ditandai oleh aktivasi protein caspase-3. Gyrus dentatus merupakan salah satu struktur pada otak yang rentan terhadap hipoksia. Daun pegagan (*Centella asiatica*) telah dikenal sebagai agen neuroprotektif dipercaya mampu mencegah kerusakan sel akibat hipoksia.

Tujuan Penelitian : Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi caspase-3 aktif pada lapisan molekuler dan granuler gyrus dentatus tikus yang diinduksi sodium nitrit sub akut.

Metode Penelitian : Penelitian eksperimental dengan desain *post-test control group* menggunakan 15 blok parafin jaringan otak tikus yang terbagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan sodium nitrit 50 mg/kgBB (P1), dan perlakuan sodium nitrit 50 mg/kgBB dan ekstrak ethanol daun pegagan 300 mg/kgBB (P2). Blok parafin disayat dengan *microtome* untuk membuat sediaan histologi, kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia dengan *antibody anticaspase 3*. Ekspresi caspase-3 dinilai dengan skor Allred dan dianalisa dengan uji *one way ANOVA*.

Hasil : Analisis rata-rata skor Allred ketiga kelompok dengan uji *one way ANOVA* menunjukkan hasil perbedaan signifikan ($P = 0,010$) dan perbandingan multivarian menunjukkan hasil perbedaan signifikan antara kelompok P1 dengan P2 ($P = 0,004$) dan kelompok P1 dengan kontrol ($P = 0,017$).

Kesimpulan : Pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan ekspresi caspase-3 aktif pada lapisan molekuler dan granuler gyrus dentatus tikus yang diinduksi sodium nitrit sub akut.

Kata Kunci : *Centella asiatica*, Sodium Nitrit, Ekspresi Caspase-3 Aktif, Gyrus Dentatus.

ABSTRACT

Background : Sodium nitrite is one of food preservatives usually contained in processed foods. High doses of sodium nitrite can lead to hypoxic tissues. Hypoxia condition cause damage in cells and trigger apoptosis which is marked by activated protein of caspase-3. Dentate gyrus is one of brain structures susceptible to hypoxia condition. Gotu kola (*Centella asiatica*) leaf is known as a neuroprotective agent and believed capable of prevent cells damaged by hypoxia.

Objectives : This study aims to determine the effect of Gotu Kola (*Centella asiatica*) leaf ethanol extracts against active caspase-3 expression on rats molecular and granular layer of dentate gyrus induced by sub acute sodium nitrite.

Methods : This study is an experimental with post-test control group design using 15 paraffin blocks of stored biological materials which are divided into three groups, the control group, treatment group 1 (P1) induced by sodium nitrite 50 mg/kg, and treatment group 2 (P2) induced by sodium nitrite 50 mg/kg and given the Gotu Kola (*Centella asiatica*) leaf ethanol extract 300 mg/kg. Paraffin blocks slashed with microtome to make histological preparation and continued to immunohistochemical staining with antibody anticaspase 3. Caspase-3 expressions were assessed with Allred score and analyzed using one-way ANOVA test.

Results : One Way ANOVA test on three groups showed significant differences result ($P = 0.010$) and multivariate comparisons showed significant differences results between P1 with P2 group ($P = 0.004$) and P1 with control group.

Conclusion : The given of Gotu Kola (*Centella asiatica*) leaf ethanol extract lower the active caspase-3 expressions on rats molecular and granular layer of dentate gyrus induced by sub acute sodium nitrite.

Keywords: *Centella asiatica*, Sodium Nitrite, Active Caspase-3 Expression, Dentate Gyrus.

PENDAHULUAN

Makanan olahan menjadi makanan pilihan masyarakat di era globalisasi ini. Namun tak dapat dipungkiri bahwa makanan olahan mengandung bahan pengawet. Salah satu bahan pengawet yang sering digunakan adalah sodium nitrit. Sodium nitrit merupakan garam anorganik yang memiliki

struktur kimia NaNO_2 . Penggunaan sodium nitrit harus sesuai dosisnya, jika berlebihan akan bersifat toksik untuk manusia dan juga hewan.¹⁴

Sodium nitrit dapat mengakibatkan hipoksia jaringan melalui interaksi antara nitrit dengan hemoglobin di dalam darah.

Dari interaksi tersebut dapat terbentuk nitrit oksida (NO), nitrat, dan methemoglobin (MetHb). Methemoglobin terbentuk dari oksidasi hemoglobin, memiliki daya ikat terhadap oksigen rendah. Selain itu NO dapat berperan sebagai radikal bebas yang akan memperburuk keadaan hipoksia. Keadaan hipoksia yang terus-menerus terjadi dapat menyebabkan stres oksidatif yang berakibat kerusakan sel terutama mitokondria. Hal ini akan memicu terjadinya apoptosis. Apoptosis merupakan kematian sel terprogram dimana aktivasi protein caspase-3 sebagai penandanya.^{15,7}

Proses terjadinya apoptosis karena sodium nitrit dapat bermanifestasi pada organ vital manusia yang salah satunya adalah otak. Gangguan juga dapat terjadi pada fungsi dari salah satu struktur otak, yaitu gyrus dentatus yang merupakan bagian dari hipokampus. Gyrus dentatus mempunyai peran terkait dengan memori. Penurunan dalam hal ingatan dan gangguan lain adalah manifestasi dari terjadinya hipoksia.¹⁷

Mekanisme hipoksia yang menyebabkan stres oksidatif dan induksi apoptosis sel dapat dicegah dengan pemberian antioksidan yang dapat

ditemukan di dalam tanaman herbal, salah satunya adalah pegagan (*Centella asiatica*).¹² Kandungan kimiawi yang dimiliki pegagan diantaranya adalah triterpen, flavonoid, alkaloid, glikosida, dan kandungan lainnya. Triterpen merupakan kandungan utama dari pegagan dan dikenal mempunyai sifat protektif sehingga diharapkan mampu melindungi organ dari kerusakan akibat stres oksidatif. Flavonoid yang banyak terkandung dalam pegagan dapat berperan sebagai antioksidan yang dapat menekan radikal bebas melalui mekanisme langsung maupun dengan modulasi enzim sehingga dapat menghindari kerusakan organ dan menghambat teraktivasinya protein caspase-3 sebagai eksekutor apoptosis.^{2,3,10}

Pada hasil penelitian lain terdapat pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun pegagan terhadap jumlah sel granuler gyrus dentatus tikus yang diinduksi sodium nitrit.⁴ Maka dari itu pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) diharapkan memberikan pengaruh positif terhadap ekspresi caspase-3 aktif sebagai penanda apoptosis pada lapisan molekuler dan granuler gyrus dentatus tikus yang diinduksi sodium nitrit sub akut.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi caspase-3 aktif pada

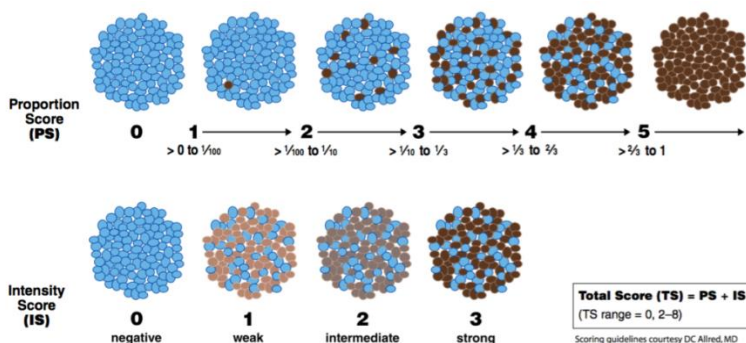
lapisan molekuler dan granuler gyrus dentatus tikus yang diinduksi sodium nitrit sub akut.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *post-test control group design*. Penelitian dilakukan selama 4 bulan, dimulai sejak bulan Maret hingga Juni 2016 bertempat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

Sampel penelitian berupa 15 blok parafin jaringan otak tikus galur Sprague-Dawley yang terbagi dalam kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2). Kelompok kontrol tidak diberikan sodium nitrit maupun pegagan. Kelompok perlakuan pertama (P1) dengan pemberian NaNO_2 dosis 50 mg/kgBB/hari sedangkan kelompok perlakuan kedua (P2) dengan pemberian NaNO_2 dosis 50 mg/kgBB/hari dan ekstrak ethanol daun pegagan 300mg/kgBB/hari. NaNO_2 dan pegagan diberikan selama 42 hari.

Blok parafin jaringan otak disayat setebal 5 μm menggunakan *rotary microtome*. Setiap blok diambil satu sayatan dan diwarnai menggunakan pewarnaan imunohistokimia (IHC) dengan *antibody anticaspase 3*. Pengamatan preparat secara histologis akan dilakukan dengan perbesaran lensa 400x pada mikroskop cahaya *Olympus CX21* dengan kamera *optilab* yang terhubung pada komputer. Komputer yang dihubungkan memiliki *software optilab viewer* untuk merekam gambar dengan pencitraan 640x480. Penilaian ekspresi caspase-3 aktif dengan kriteria skor Allred akan dilihat skor proporsi dan skor intensitas. Skor proporsi dinilai dari 0 hingga 5 dan skor intensitas dinilai dengan 0 hingga 3. Penghitungan total ekspresi caspase-3 aktif didapat dari penjumlahan antara skor proporsi dan skor intensitas dengan skor minimal 0 dan maksimal 8.¹

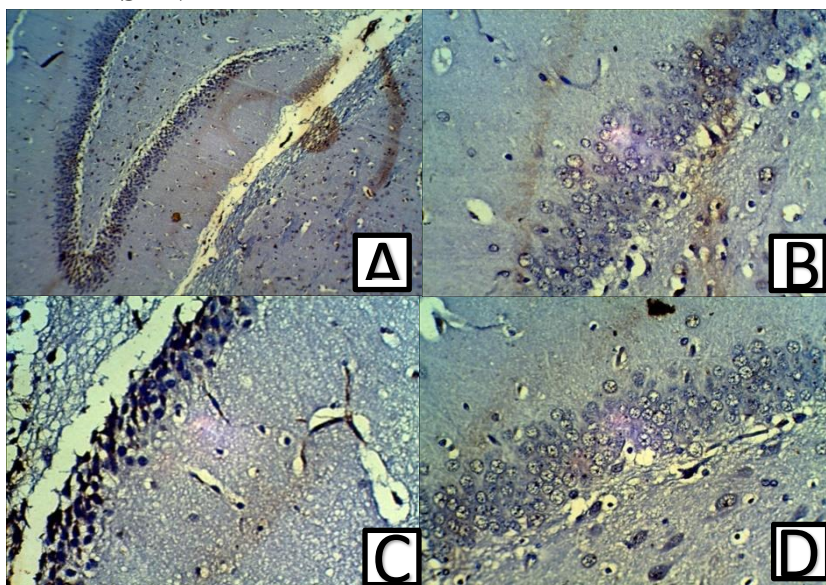


Gambar 1. Skor Allred dan Interpretasinya (Allred, 2005)

Hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) 1 jalan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dan

ditunjukkan nilai $p = 0,010$. Kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Tukey HSD* untuk perbandingan multivarian.

HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 2. Hasil Pengamatan

Keterangan: A: Gambaran histologi gyrus dentatus pada perbesaran 10x10. B: sel granuler gyrus dentatus pada kelompok kontrol perbesaran 40x10. C: sel granuler gyrus dentatus pada kelompok perlakuan 1 perbesaran 40x10. D: sel granuler gyrus dentatus pada kelompok perlakuan 2 perbesaran 40x10.

Ekspresi caspase 3 aktif ditandai dengan sitoplasma sel yang bewarna kecoklatan dan dihitung berdasarkan skor

allred. Seperti yang terlihat pada gambar 2, jika dibandingkan dengan gambar (C), Gambar (B) hanya sedikit sel yang

kecoklatan dan juga intensitasnya lemah, selain itu jumlah selnya masih banyak. Pada Gambar (C) warna kecoklatan terlihat pada hampir seluruh sel dengan intensitas yang kuat, memberikan arti bahwa sel telah mengekspresi caspase 3 aktif dengan jumlah yang banyak. Selain itu terdapat banyak sel anomali dan jumlah sel granuler total pada lapang pandang sedikit, hal ini menandakan terdapat pengurangan jumlah sel akibat apoptosis. Berbeda dengan Gambar (C), pada Gambar (D) memperlihatkan hasil hampir sama dengan Gambar (B), sel granuler terlihat banyak dengan minimnya jumlah sel yang apoptosis.

Hasil rata-rata skor allred dari setiap sampel pada kelompok kontrol, perlakuan 1,

dan perlakuan 2 dianalisis dengan uji normalitas untuk mengetahui data tersebar secara normal atau tidak normal dan untuk menentukan analisis dengan menggunakan *Analysis of Variance one way (ANOVA)* atau *Kruskall-Wallis*. Uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa sampel berasal dari populasi yang terdistribusi normal dengan hasil $>0,05$. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas data menggunakan uji *levene* dengan hasil menunjukkan subjek berasal dari populasi yang homogen. Karena populasi sampel terdistribusi normal, maka analisis dapat dilakukan dengan menggunakan *Analysis of Variance one way (ANOVA)*.

Tabel 1. Hasil Analisa Deskriptif Skor Allred

Kelompok	Minimum	Maksimum	Mean	SD	One Way ANOVA
Kontrol	3,923	7,417	5,68760	1,257125	
Perlakuan 1	6,385	7,615	7,10560	0,505531	0,010
Perlakuan 2	4,727	5,636	5,28180	0,352700	

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

Kelompok	Kontrol	Perlakuan 1	Perlakuan 2
Kontrol		0,017	0,443
Perlakuan 1	0,017		0,004
Perlakuan 2	0,433	0,004	

Dari analisis rerata skor Allred dengan uji *one way* ANOVA pada sel neuron lapisan molekuler dan granuler gyrus dentatus tikus dengan pemberian sodium nitrit dan ekstrak ethanol daun pegagan menunjukkan perbedaan yang signifikan karena didapatkan nilai signifikansi 0,010 dengan *p-value* < 0,05 dan menggunakan $\alpha = 95\%$. Hal ini berarti bahwa pemberian ekstrak ethanol daun pegagan dapat memberikan efek neuroprotektif pada sel neuron lapisan molekuler dan granuler gyrus dentatus tikus dan memiliki efek yang sepadan dengan yang tidak diberikan induksi sodium nitrit. Pada uji *comparison* antara kelompok perlakuan 1 dibandingkan kelompok kontrol menunjukkan perbedaan signifikan dengan nilai 0,017. Dapat diartikan bahwa pemberian sodium nitrit sub akut pada tikus dapat meningkatkan ekspresi caspase-3 aktif yang menandakan kejadian apoptosis sel meningkat pada lapisan molekuler dan granuler gyrus dentatus pada kelompok perlakuan 1.

Sodium nitrit sebagai pencetus hipoksia dapat menyebabkan kerusakan sel piramidal hipokampus dan neuron granuler gyrus dentatus.¹⁷ Kerusakan sel terjadi akibat hipoksia dan stres oksidatif. Hipoksia

dapat menyebabkan perubahan morfologi dan kerusakan permanen sel neuron pada otak tikus dan terjadinya kebocoran membran mitokondria yang mengakitnya sitokrom-c akan masuk ke dalam sitosol dan akan terjadi aktivasi protein pencetus apoptosis. Sel neuron yang mengalami kerusakan dapat menyebabkan terjadinya apoptosis.⁶ Hipoksia akut yg disebabkan sodium nitrit (2ml/kg IV) menghasilkan akumulasi glikolipid yang menandakan intensitas peroksidasi lipid di mitokondria dan *synaptosome*.¹¹ Pada penelitian lain, 50 tikus jantan Sprague-Dawley yang diberikan sodium nitrit per oral 80mg/kg terbukti meningkatkan stres oksidatif, selain itu sodium nitrit juga mereduksi sitokrom C oksidase dan meningkatkan aktivitas aktivitas caspase-3 dan fragmentasi DNA sehingga menyebabkan apoptosis sel hepatosit.¹⁴

Pada analisis data uji *comparison* antara kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 menunjukkan nilai $p = 0,443$ yang artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan atau merupakan kelompok yang sepadan dengan rerata skor Allred yang hampir sama. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak

ethanol daun pegagan memiliki kesamaan dengan kelompok kontrol. Nilai tersebut diperkuat dengan signifikannya nilai analisis data perbandingan antara kelompok perlakuan 1 dengan kelompok perlakuan 2 yaitu 0,004 dengan $p\text{-value} < 0,05$. Pada kelompok perlakuan 2 memiliki rerata skor Allred yang lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan 1 yang berarti bahwa pemberian ekstrak ethanol daun pegagan dapat menurunkan ekspresi caspase-3 aktif pada lapisan molekuler dan granuler yang diinduksi sodium nitrit sub akut sehingga dapat memproteksi sel dan mencegah hilangnya sel akibat apoptosis.

Pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) telah terbukti menurunkan ekspresi caspase-3 aktif pada lapisan molekuler dan granuler gyrus dentatus. Hal ini dikarenakan kandungan flavonoid dan *triterpen* di dalam pegagan sehingga memberikan efek neuroprotektif. Flavonoid berfungsi sebagai antioksidan sehingga dapat memproteksi dari neurotoksik.⁵ Pegagan memiliki efek protektif dengan kandungan asiatikosid dan peningkatan enzim antioksidannya berupa superoksida dismutase, glutathion peroksidase, yang memiliki efek signifikan

pada proteksi bahaya radikal bebas yang diperantarai oleh jalur *Extracellular signal-Regulated kinase- ribosomal S6 kinase*.² *Triterpen* mempunyai efek antiapoptosis melalui komponen asam asiatik. Asam asiatik yang diberikan per oral selama 30 hari dapat mencegah gangguan kognitif dan melindungi sel-sel SH-SY5Y terhadap apoptosis akibat induksi neurotoksik glutamat, asam asiatik menghambat MMP yang mampu melepaskan sitokrom C dan aktivasi caspase yang berdampak kematian sel. Selain itu asam asiatik juga terbukti menurunkan kerusakan sel neuron pada lapisan CA1 dan CA3 hipokampus.¹⁶

Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antioksidan mempunyai efek meningkatkan sistem imun terhadap radikal bebas dan juga mencegah stres oksidatif. Flavonoid dan selenium di *Centella asiatica* berperan sebagai antioksidan kuat untuk merangsang pematangan sel, meningkatkan kesehatan fisik dan mental (Hasyim, 2011). Flavonoid dapat melindungi otak dari jejas yang diinduksi oleh neurotoksin dan menekan neuroinflamasi, serta berpotensi meningkatkan memori pada penyakit neurodegeneratif. Hal tersebut berkaitan dengan mekanisme kerja flavonoid yang

memodulasi protein kinase dan kaskade sinyal lipid kinase, seperti PI3 kinase, protein kinase C, dan *mitogen activated – protein* (MAP) kinase sehingga terjadi perubahan ekspresi gen dan aktivitas caspase. Penghambatan terhadap aktivasi caspase menyebabkan flavonoid mampu menghambat kerusakan sel saraf yang diinduksi oleh stres oksidatif. Selain berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi, flavonoid meningkatkan fungsi endotelial dan aliran darah perifer sehingga meningkatkan aliran darah otak (*cerebral blood flow/ CBF*) dan memicu neurogenesis di hipokampus. Sel saraf yang baru terbentuk tersebut akan memiliki hubungan antar sinaps yang efektif sehingga meningkatkan fungsi memori.³ *Centella asiatica* juga memiliki efek farmakologi, yaitu sebagai antioksidan. Pada penelitian sebelumnya yang melihat potensi antioksidan dari *polyphenol*, flavonoid, β -*carotene*, tannin and vitamin C yang diekstraksi dengan ethanol 50%, ethanol 100%, dan air.¹²

Penelitian lain yang juga membuktikan bahwa *Centella asiatica* secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) pada

korteks prefrontal tikus yang diinduksi stres restrain kronik selama 21 hari. Bcl-2 merupakan salah satu protein antiapoptosis yang berfungsi untuk menjaga permeabilitas membran mitokondria.⁹ Pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan ekspresi Bax pada neuron pyramidal CA1 hippocampus tikus yang diinduksi dengan sodium nitrit subakut.¹³ Terdapat pengaruh pemberian daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap jumlah sel granuler gyrus dentatus tikus yang diinduksi sodium nitrit sub akut. Selain itu terdapat perbedaan jumlah sel granuler gyrus dentatus tikus antar kelompok perlakuan.⁴ Pemberian ekstrak ethanol *Centella asiatica* terhadap ekspresi caspase-3 pada korteks prefrontal tikus yang diinduksi stres restrain kronik, menunjukkan penurunan ekspresi caspase-3 pada tikus yang diberi *Centella asiatica*. Pada penelitian tersebut didapatkan perbedaan signifikan ekspresi caspase-3 antara kelompok yang mendapat perlakuan stres restrain kronik selama 21 hari dengan kelompok yang mendapat perlakuan stres restrain kronik ditambah dengan pemberian ekstrak ethanol *Centella asiatica* dosis 150, 300, dan 600 mg/kgBB/hari.⁸

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan, perhitungan jumlah, dan hasil analisis data ekspresi caspase-3 aktif pada blok parafin bahan biologi tersimpan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi caspase-3 aktif pada sel neuron lapisan molekuler dan granuler gyrus

dentatus tikus yang diinduksi sodium nitrit sub akut, dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian ekstrak ethanol daun pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan ekspresi caspase-3 aktif pada lapisan molekuler dan granuler gyrus dentatus tikus yang diinduksi sodium nitrit sub akut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Allred, D. C., 2005. Assessment of Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer by Immunohistochemistry. *Connection*. 9: 4-5.
2. Gohil, K.J., Patel, J.A. & Gajjar, A.K., 2010. Pharmacological Review on *Centella asiatica*: A Potential Herbal Cure-all. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(5), p.546-556.
3. Halim, H.D.P., Ibrahim, N., 2013. Efek Neuroprotektif Ekstrak Akar *Acalypha indica* 500 mg/kgBB terhadap Perubahan Inti Sel Saraf Hipokampus Pascahipoksia Serebri. *Jurnal FKUI*. 1(2): 113-117.
4. Haqi, A., 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Jumlah Sel Granuler Girus Dentatus Tikus (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi Natrium Nitrit Sub Akut. *Skripsi*. Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran. Universitas Islam Indonesia.
5. Hashim, P., 2011. MiniReview *Centella asiatica* in Food and Beverage Applications and Its Potential Antioxidant and Neuroprotective Effect. *International Food Research Journal*, 18(4): 1215-1222.
6. Hidayat, A., Wiradisastra, K., Hernowo, B.S., Achmad, T.H., 2011. Ekspresi Bcl-2 dan *Caspase-3* Pasca Paparan Hipoksia Hipobarik Intermiten. *Bandung Medical Journal*. 43(4): 166-170.
7. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., 2005. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Elsevier Saunders. Philadelphia.
8. Kuswati., 2015. The Effect of *Centella asiatica* Ethanolic Extract on *Caspase-3* Expression In Prefrontal Cortex Of Chronic Restraint Stress Induced Sprague Dawley Rat. *Indonesia Journal of Medicine and Health*. 7(2): 65-72.

9. Kuswati., Prakosa, D., Wasita, B., Wiyono, N., 2015. *Centella asiatica* Increases B-Cell Lymphoma 2 Expression in Rat Prefrontal Cortex. *Universa Medicina*. 34: 10-16.
10. Orhan, I.E., 2012. *Centella asiatica* (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. *Hindawi Publishing Corporation*. 2012: 1-8.
11. Petrova, E.B., Dishkelov, A.T., Vasileva, E.G., 2011. Glycolipid Changes in Rat Brain Mitochondria and Synaptosomes Following Experimental Hypoxia. *MD-Medical Data*. 3 (4): 331-334.
12. Rahman, M., Hossain, S., Rahaman, A., et al. 2013. Antioxidant Activity of *Centella asiatica* (Linn.) Urban: Impact of Extraction Solvent Polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1(6): 27-32.
13. Santoso, A.M.F., 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Bax pada Neuron Pyramidal CA1 Hippocampus Tikus (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi Sodium Nitrit Sub Akut. *Skripsi*. Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran. Universitas Islam Indonesia.
14. 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): 114-121.
15. Vega-Villa, K., Pluta, R., Lonser, R., Woo., 2013. Quantitative Systems Pharmacology Model of NO Metabolome and Methemoglobin Following Long-Term Infusion of Sodium Nitrite in Humans. *Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2(60): 1-10.
16. Xu, M., Xiong, Y., Liu, J., Qian, J., Zhu, L., et al., 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.
17. Zaidi, Z.F., 2010. Sodium Nitrite-Induced Hypoxic Injury in Rat Hippocampus. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 26(3): 532-537.