

EFEKTIVITAS EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*) DALAM PENCEGAHAN EKSPRESI GEN CASPASE 8 PADA SEL PYRAMIDAL TIKUS MODEL DEMENSIA

Sapto Yuliani*, Suci Kurniati, Desi Iswahyuni, Vivi Sofia, Wahyu Widyaningsih,
Moch. Saiful Bachri

Program Studi Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan
Jalan Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Yogyakarta 55164
*Email Korespondensi: sapto.yuliani@pharm.uad.ac.id

Diterima : 30 Maret 2021

Direvisi : 8 Desember 2021

Disetujui : 13 Desember 2021

Copyright © 2021 Universitas Pakuan



FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi is licensed under a
Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License

ABSTRAK

Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah peningkatan ekspresi protein caspase 3 dan menurunkan ekspresi Bcl-2 yang berkaitan dengan apoptosis di daerah CA1 dan CA2-CA3 sel pyramidal hippocampus pada tikus model demensia. Selain ekspresi protein tersebut, mekanisme apoptosis juga melibatkan protein lain yaitu caspase 8, yaitu protease sistein yang berperan sebagai inisiator apoptosis di jalur ekstrinsik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak pegagan dalam mencegah ekspresi gen caspase 8 di sel pyramidal hippocampus pada tikus model demensia yang diinduksi dengan trimetiltin (TMT). Sebanyak 30 ekor tikus Sprague Dawley, 3 bulan, jantan, berat 200-300 g dibagi menjadi 6 kelompok. sebagai berikut: Kelompok Normal dan TMT diberi CMC-Na, kelompok ekstrak diberi ekstrak dosis 100 (EP-100), 200 (EP-200) dan 400 mg/kg BB (EP-400), sedangkan kelompok Sitikolin diberi sitikolin dosis 200 mg/kg B. Pemberian perlakuan selama 35 hari. Injeksi TMT dilakukan pada hari ke-8 perlakuan dengan dosis 8 mg/kg BB secara intraperitoneal, kecuali pada kelompok normal. Pada hari ke 36 tikus dikorbankan, otak diambil, kemudian bagian hippocampus dipisahkan untuk pembuatan preparat imunohistokimia untuk pengamatan ekspresi gen caspase 8 di sel pyramidal daerah CA1 dan CA2CA3. Jumlah sel yang mengekspresikan gen caspase 8 pada sel pyramidal di daerah CA1 dan CA2CA3 dianalisis dengan uji anava satu jalur dilanjutkan dengan uji LSD dengan tingkat signikansi 0.05. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian TMT meningkatkan secara signifikan jumlah sel yang mengekspresikan caspase 8 di daerah CA1 namun tidak pada daerah CA2CA3. Pemberian ekstrak pegagan dosis 400 mg/kg BB menurunkan secara signifikan ekspresi caspase 8 namun tidak terjadi pada dosis 100 dan 200 mg/kg BB. Dengan demikian ekstrak pegagan berpotensi dikembangkan untuk mencegah demensia.

Kata kunci : Pegagan; caspase 8; demensia; trimetiltin

THE EFFECTIVENESS OF GOTU COLA (*Centella asiatica*) EXTRACT IN PREVENTING EXPRESSION OF CASPASE 8 GENE ON PYRAMIDAL CELLS OF DEMENTIA MODEL RAT

ABSTRACT

Previous studies have shown that offering gotu kola (*Centella asiatica*) extract may prevent the increase in protein caspase 3 expression and decrease Bcl-2 expression associated with apoptosis in the CA1 and CA2-CA3 regions of the pyramidal hippocampus cell in dementia model rats. Apart from these expressions, apoptosis also involves another protein, namely caspase 8, a cysteine protease that acts as an initiator of apoptosis in the extrinsic pathway. The purpose of this study was to determine the effect of gotu kola extract in preventing the caspase 8 gene of pyramidal hippocampus cells in trimethyltin (TMT) induced dementia rat. Thirty Sprague Dawley rats, 3 months old, male, weighing 200-300 g were divided into 6 groups as follows: Group I and II were given CMC-Na, groups III, IV and V were given an extract dose of 100, 200 and 400 mg / kg BW, while group VI was given citicoline at a dose of 200 mg / kg B. The treatment was given for 35 days. TMT injection was carried out on the 8th day of treatment with a dose of 8 mg / kg BW intraperitoneally, except for group I. On the 36th day the rats were sacrificed, the brain was taken, then the hippocampus was used for making immunohistochemical preparations to observe the expression of the caspase 8 gene in pyramidal cells. CA1 and CA2CA3 areas. The number of cells expressing the caspase 8 gene in pyramidal cells in the CA1 and CA2CA3 regions was analyzed using an interactive one-way ANOVA test with LSD with a significance level of 5%. The results showed that presenting TMT significantly increased the number of cells expressing caspase 8 in the CA1 region but not in the CA2CA3 region. The administration of gotu kola extract at a dose of 400 mg / kg BW significantly decreased the expression of caspase 8 but did not occur at doses of 100 and 200 mg / kg BW. Thus gotu kola extract has the potential to be developed to prevent dementia.

Key word : Gotu cola; caspase 8; demensia; trimethyltin

PENDAHULUAN

Hippocampus bersama bagian-bagian di cerebrum (otak besar) memiliki peran yang sangat besar dalam fungsi kognisi termasuk belajar dan ingatan (Guyton, A.C., Hall, 2006). Namun demikian hippocampus dan bagian korteks otak, daerah utama transmisi kolinerjik untuk memonitor proses belajar dan ingatan, merupakan daerah yang peka terhadap kerusakan oksidatif. Kerusakan oksidatif terjadi karena adanya radikal bebas seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan (*Reactive Nitrogen Species*) yang bersifat reaktif. Radikal bebas berperan dalam oksidasi berbagai makromolekul dalam sel terutama lipid, protein dan DNA sehingga dapat memicu kematian sel berupa apoptosis (Palipoch, 2015). Apoptosis di daerah CA1 atau CA3 hippocampus dapat menyebabkan gangguan sinapsis pada daerah tersebut dan

berkontribusi pada penurunan fungsi memori yang menjadi gejala utama demensia (Guyton dan Hall, 2006; Fukui *et al.*, 2002; Sutherland, 1983)

Mekanisme spesifik apoptosis neuronal dapat berkaitan dengan siklus sel neuron yang tidak normal, gangguan ekspresi gen yang berkaitan dengan apoptosis dan adanya radikal bebas. Tiga ciri utama perubahan biokimia dalam apoptosis, yakni aktivasi caspase, pecahnya DNA dan protein, dan perubahan pada membran sehingga dapat dikenali oleh sel-sel fagosit (O'Brien, 2008). Aktivasi caspase menyebabkan keluarnya protein vital selular dan memecah kerangka nuklear serta dinding sel. Salah satu famili caspase adalah caspase 8, yaitu protease sistein yang berperan sebagai inisiator apoptosis di jalur ekstrinsik. Apoptosis jalur ekstrinsik dimulai dari

adanya pelepasan molekul sinyal yang disebut ligan, yang akan berikatan dengan reseptor kematian yang terletak pada transmembran sel target yang menginduksi apoptosis. Ligan yang berikatan dengan reseptor tersebut mengakibatkan caspase inisiator 8 membentuk trimer dengan adaptor protein *fas-associated protein with death domain* (FADD) yang pada akhirnya akan mengaktifkan caspase eksekutor sehingga sel mengalami apoptosis (Wong, 2011).

Herba Pegagan (*Centella asiatica*) telah digunakan sebagai obat tradisional di Cina dan negara-negara di Asia Tenggara. Tanaman pegagan merupakan tanaman terna menahun, tidak berbatang, mempunyai rimpang pendek dan stolon-stolon yang merayap. Efek farmakologik herba Pegagan yang telah dilaporkan adalah aktivitas sebagai antioksidan, antidiabetik, antimikroba, antitumor, penyembuhan luka, penenang, dan neuroprotektif (Prakash *et al.*, 2017). Berbagai studi melaporkan bahwa senyawa antioksidan terbukti dapat mencegah terjadinya apoptosis. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian ekstrak herba pegagan dapat mencegah penurunan memori spasial tikus Sprague Dawley yang diinjeksi trimetiltin (Yuliani dan Sulistyani, 2018). Penurunan memori spasial berkaitan dengan jumlah sel pyramidal (CA1 dan CA2CA3) di hippocampus. Penelitian selanjutnya juga membuktikan bahwa ekstrak pegagan mampu mencegah peningkatan ekspresi caspase 3 dan menurunkan ekspresi Bcl-2 (Akbar, 2019; Yuliani *et al.*, 2018). Peristiwa apoptosis banyak memerlukan protein-protein lain yang terlibat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak pegagan dalam mencegah ekspresi gen caspase 8 di sel pyramidal hippocampus pada tikus model demensia yang diinduksi dengan trimetiltin (TMT).

METODE KERJA

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian

ini alat maserasi, corong Buchner, *rotary evaporator* (Heidolph), timbangan (Ohaus), seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas, mikroskop binokuler (Olympus), optilab (Miconos).

Bahan

Bahan yang digunakan adalah serbuk herba pegagan yang diperoleh dari CV, Merapi Farma Yogyakarta, etanol 70% (Sigma Aldrich, , St. Lois, USA). TMT-klorida (Sigma Aldrich, St. Lois, USA), NaCl 0,9%, CMC-Na, antibodi primer caspase 8 (Scytek)

Pembuatan Ekstrak Pegagan

Herba pegagan kering dibeli dari CV Merapi Farma, Yogyakarta, Indonesia. Herba kemudian diserbuk, dan sebanyak 500 mg serbuk kemudian dimaserasi dengan 2.5 L ethanol 70% selama 24 jam. Maserasi dilakukan dua kali dengan pelarut yang sama. Hasil maserasi disaring dengan corong Buchner dan selanjutnya dikentalkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Sebelum ekstrak diberikan pada hewan uji, ekstrak disuspensikan dengan *sodium carboxymethyl cellulose* (CMC-Na).

Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji berupa tikus galur *Sprague Dawley* (SD), jantan, berat badan 150-200 g umur 1,8-2 bulan (umur dewasa), diperoleh dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM), Jakarta. Perlakuan hewan uji sudah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Universitas Ahmad Dahlan dengan nomor 011804050.

Tikus dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor. Sebelum mendapat perlakuan, tikus diadaptasikan selama 1 minggu dengan kondisi laboratorium pada suhu kamar, mendapat pakan standar dan minum *ad libitum*. Pengelompokan hewan uji adalah sebagai berikut:

Normal : diberi pelarut ekstrak herba pegagan (CMC-Na) secara per oral (p.o)

TMT : diberi pelarut ekstrak herba pegagan (CMC-Na) secara p.o

Sitikolin : diberi sitikolin dosis 200 mg/kg BB p.o

EP-100 : diberi ekstrak pegagan dosis 100 mg /kg BB p.o

EP-200 : diberi ekstrak pegagan dosis 200 mg/kg BB p.o

EP-400 : diberi ekstrak pegagan dosis 400 mg/kg BB p.o

Pemberian perlakuan dari hari ke 1 sampai hari ke 35. Injeksi TMT secara intraperitoneal (i.p) dosis 8 mg/kgBB dilakukan pada semua kelompok pada hari ke 8 perlakuan, kecuali kelompok Normal. Pada hari 36 tikus dikorbankan dengan inhalasi CO₂. Otak tikus diambil, dan dimasukkan ke dalam buffer formalin selama 6 hari. Hippocampus kemudian dipisahkan untuk dibuat blok paraffin sesuai metode standar yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, UGM.

Pulasan imunohistokimia Caspase 8

Blok paraffin hippocampus dipotong dengan ketebalan 3 µm kemudian diletakkan pada slide *poly-L-lysine*. Selanjutnya dilakukan pulasan imunohistokimia caspase 8 menggunakan prosedur ULTRATEK HRP *Anti-polyvalent (DAB) Staining Complete System* (Scytek Laboratories) sesuai yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Sardjito, Yogyakarta (Yuliani *et al.*, 2021). Pengamatan ekspresi caspase 8 dilakukan dengan menggunakan mikroskop binokuler yang dihubungkan dengan optilab, Jumlah sel pyramidal yang mengekspresikan protein caspase 8 dihitung berdasarkan total jumlah dari 3 irisan

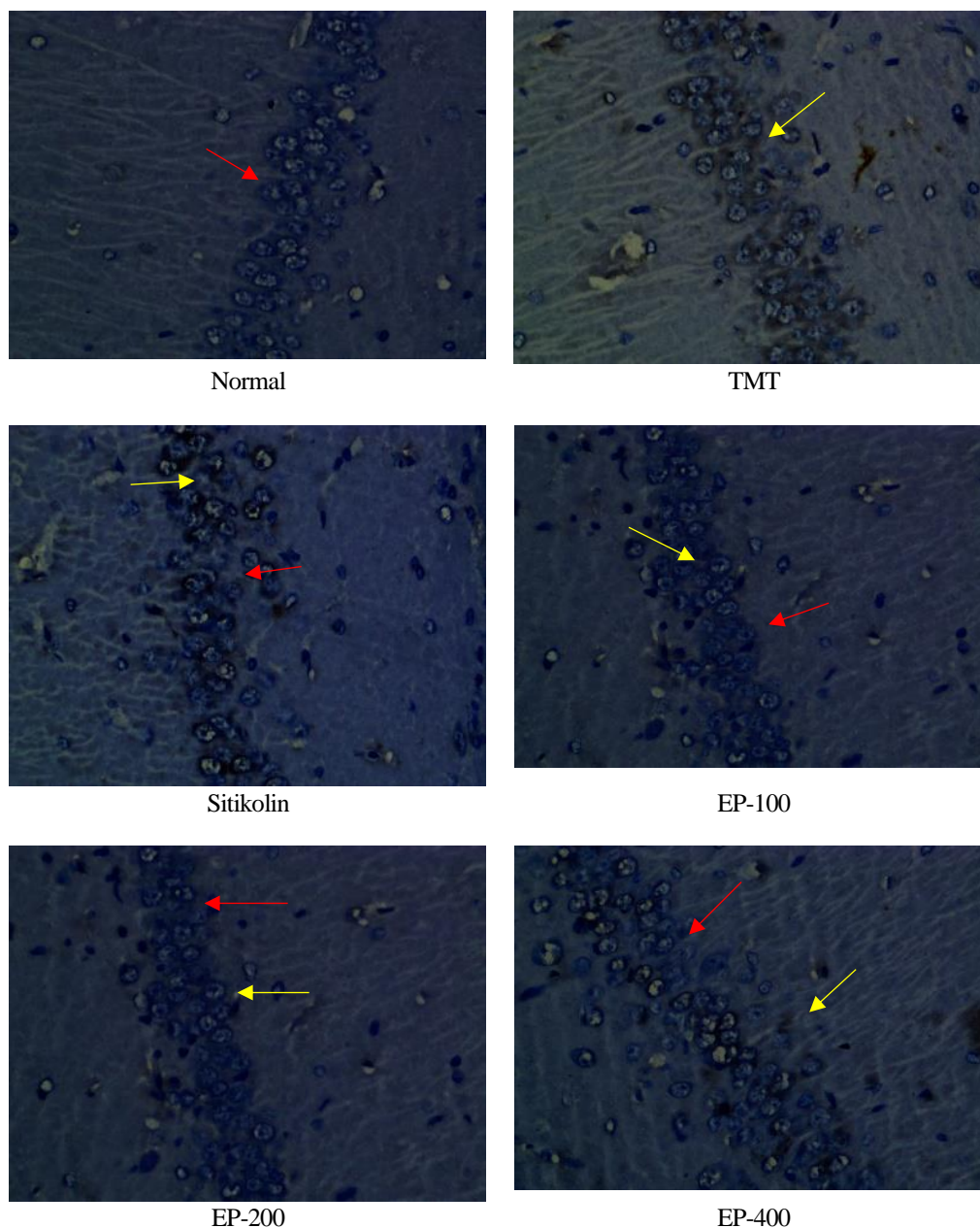
mikroskopik jaringan hippocampus dari masing-masing sel pyramidal daerah CA1 maupun di daerah CA2CA3.

Analisis data

Data jumlah ekspresi gen caspase 8 di el pyramidal di daerah CA1 dan CA2CA3 dianalisis secara statistik dengan uji *one way anova* dilanjutkan uji *posthoc* LSD dengan tingkat signifikansi 0.05.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini model demensia pada tikus dilakukan dengan injeksi TMT. TMT merupakan senyawa yang bersifat neurotoksik (Hattori *et al.*, 2011). Sel saraf yang peka terhadap efek toksik TMT salah satunya adalah hippocampus (Balaban, 1998). Efek toksik TMT menyebabkan penurunan jumlah sel pyramidal terutama pada daerah yang peka yaitu daerah CA3 dan CA1. TMT dapat menginduksi *apoptotic cascade* (Robertson *et al.*, 1987). Berdasarkan hasil pengamatan imunohistokimia ekspresi gen caspase 8 di sel pyramidal daerah CA1 maupun CA2CA3 hippocampus menunjukkan bahwa pada kelompok TMT, secara kualitatif menunjukkan ekspresi caspase 8 yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok normal. Ekspresi gen caspase 8 ditunjukkan dengan sitoplasma dan inti yang berwarna coklat. Ekspresi gen caspase 8 terlihat berkurang di daerah CA1 dengan pemberian sitikolin maupun ekstrak pegagan (Gambar 1 dan Gambar 2) namun tidak terjadi di daerah CA2CA3.

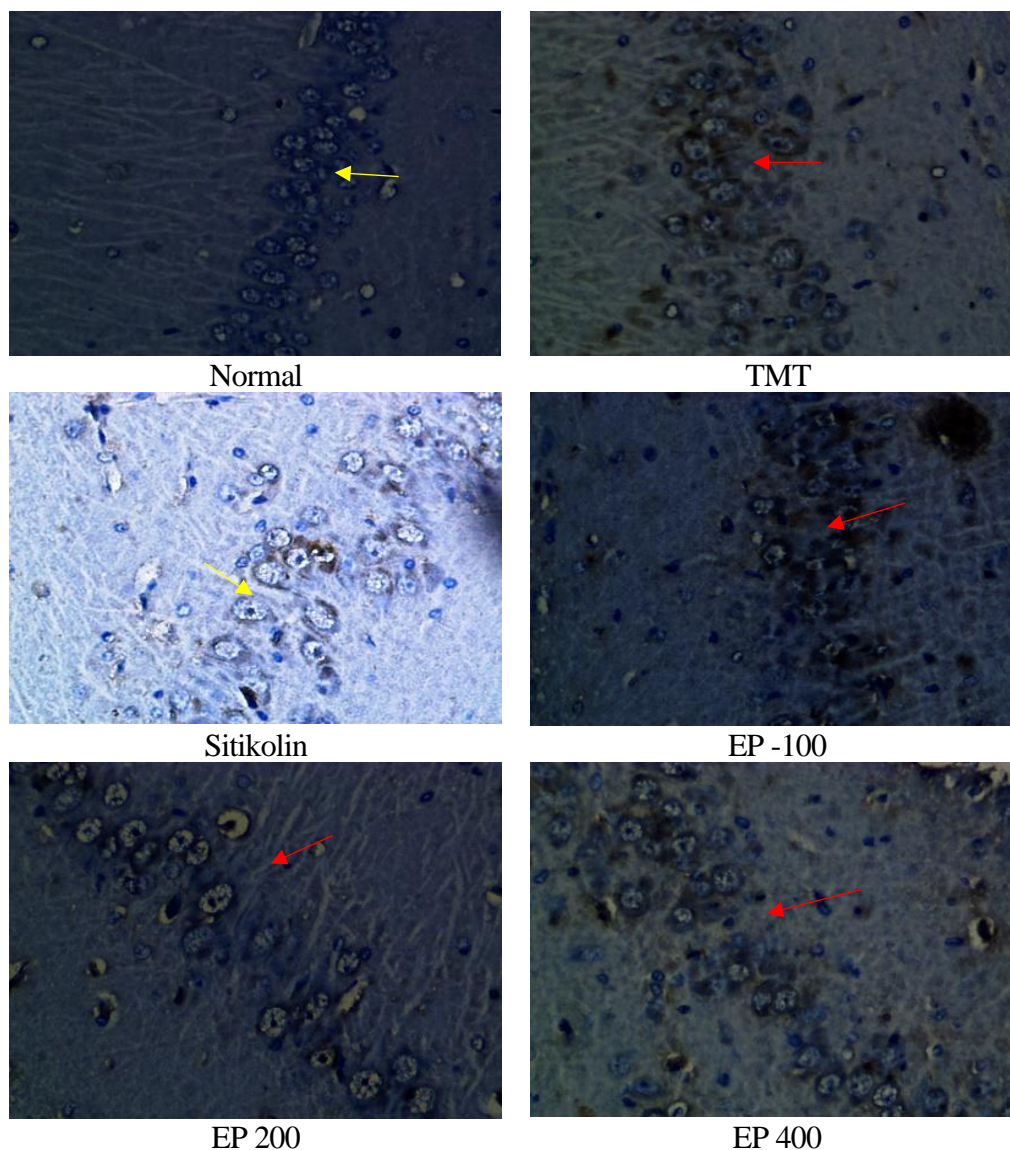


Gambar 1. Pulasan imunohistokimia sel pyramidal hippocampus di daerah CA1 hippocampus pada semua kelompok perlakuan. Sel yang mekspresikan gen caspase 8 terlihat warna coklat pada sitoplasmanya (), sedangkan sel yang tidak mengekspresikan gen caspase 8 berwarna biru (). Perbesaran 400x.

Tabel 1. Hasil Perhitungan Jumlah Sel yang Mengekspresikan Gen Caspase 8 di Daerah CA1

No.	Kelompok	Rerata ± SD
1.	Normal	54,75 ± 58,71*
2.	TMT	132,25 ± 18,23
3.	Sitikolin	126 ± 74,89
4.	EP-100	141,5 ± 67,84
5.	EP-200	105,75 ± 45,06
6.	EP-400	69 ± 22,64 *

Keterangan: * berbeda bermakna dengan kelompok TMT (p<0,05)



Gambar 2. Pulasan imunohistokimia sel pyramidal hippocampus di daerah CA2CA3 hippocampus pada semua kelompok perlakuan. Sel yang mekspresikan gen caspase 8 terlihat warna coklat pada sitoplasmanya (), sedangkan sel yang tidak mengekspresikan gen caspase 8 berwarna biru (). Perbesaran 400x.

Tabel 2. Hasil Perhitungan Jumlah Sel yang Mengekspresikan Gen Caspase 8 di Daerah CA2CA3.

No.	Kelompok	Rerata ± SD
1.	Normal	94 ± 67,76 *
2.	TMT	158,5 ± 91,09
3.	Sitikolin	100,25 ± 56,39
4.	EP-100	132,75 ± 75,10
5.	EP-200	105,75 ± 45,06
6.	EP-400	129,75 ± 42,02

Keterangan: * berbeda bermakna dengan kelompok TMT (p<0,05)

Untuk mengetahui jumlah sel yang mengekspresikan gen caspase 8 kemudian dilakukan perhitungan didasarkan dari 3 irisan mikroskopik masing-masing hippocampus.

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tikus yang diinjeksi TMT mengalami peningkatan ekspresi gen caspase 8 secara signifikan pada sel pyramidal daerah CA1 dan CA2CA3. Adanya ekspresi protein caspase 8 menunjukkan adanya sel yang mengalami kematian melalui proses apoptosis. Mekanisme TMT dalam menimbulkan efek toksik belum diketahui seluruhnya dengan pasti (Robertson *et al.*, 1987). Kerusakan pada sel yang sensitif terhadap TMT berkaitan dengan stres oksidatif, *calcium overload* dan kerusakan mitokondria (Buck *et al.*, 2004). Kerusakan oksidatif dapat disebabkan oleh induksi berbagai spesies reaktif radikal dan non radikal yang meliputi *reactive oxygen spesie* (ROS), *reactive nitrogen spesies* (RNS) dan *reactive aldehyde spesies* (Weinert dan Timiras, 2003). Radikal bebas oksigen yang paling reaktif di dalam tubuh adalah anion superoksida (O₂⁻), hidroksi radikal (OH) dan hidrogen peroksida (H₂O₂) (Gawel *et al.*, 2004). TMT meningkatkan aktivitas radikal bebas di dalam sel sehingga terjadi stres oksidatif yang menjadi faktor penting terhadap gangguan neurodegeneratif (Liu *et al.*, 2010).

Kerusakan mitokondria kemungkinan dimediasi oleh protein stannin (SNN), yaitu sebuah protein dengan 88 asam amino yang dikode oleh cDNA dari sel yang sensitif terhadap TMT (Buc *et al.*, 2004). SNN kemungkinan terletak di membran luar mitokondria (Billingsley *et al.*, 2006) dan membran retikulum endoplasma (Davidson *et al.*, 2004). SNN akan mengikat secara langsung dengan dimetilin (hasil demetilasi TMT), sehingga menyebabkan pelepasan sitokrom c dan aktivasi berbagai caspase (Geloso *et al.*, 2002). *Calcium overload* terjadi tergantung pada penyimpanan

ekstraselular yang ada pada mitokondria dan retikulum endoplasma, kemudian menyebabkan aktivasi *Calpain* dan *Cathepsin D* yang akan memicu terjadinya apoptosis (Billingsley *et al.*, 2006).

Berdasarkan hasil uji statistik menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pegagan dosis 400mg/kgBB pegagan mampu menurunkan ekspresi gen caspase 8 di sel pyramidal hippocampus daerah CA1 namun tidak dapat menurunkan ekspresi gen caspase 8 di daerah CA2-CA3. Perbedaan aktivitas ekstrak pegagan di daerah CA1 dan CA2-CA3 kemungkinan adanya perbedaan efektifitas ekstrak pegagan terhadap kedua daerah tersebut. Ekstrak pegagan memiliki efek pro-kognitif pada manusia dan rodensia (Gupta *et al.*, 2003). Ekstrak pegagan mengandung asiatikosida yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Senyawa antioksidan terbukti dapat mencegah terjadinya apoptosis melalui aktivasi *scavenging* radikal bebas intraselular dan mitokondria dengan mengaktifkan enzim antioksidan seperti superoksida dismutase dan katalase sehingga dapat mencegah proses apoptosis sel. Proses apoptosis melibatkan caspase 8 yang berperan sebagai inisiator. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa pemberian ekstrak pegagan dapat mencegah penurunan memori spasial tikus Sprague Dawley yang diinjeksi trimetiltin (Yuliani dan Sulistyani, 2018)

Berdasarkan hasil uji statistik menunjukkan bahwa pemberian sitikolin belum mampu mencegah peningkatan ekspresi gen caspase 8 di daerah CA1 dan CA2-CA3 sel pyramidal hippocampus. Hal ini kemungkinan karena mekanisme sitikolin dalam mencegah apoptosis tidak melalui caspase 8. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa sitikolin dapat mencegah apoptosis melalui penurunan ekspresi caspase 3 di daerah CA2-CA3. Selain itu sitikolin juga mampu meningkatkan kadar GSH dan aktivitas GPx, SOD serta katalase otak pada tikus Sprague Dawley yang diinduksi TMT (Yuliani *et al.*, 2018). Dalam

penelitian ini digunakan sitikolin karena sitikolin memiliki efek menguntungkan pada fungsi neurologis dalam memori (Alvarez dan Roman, 2011). Mekanisme kerja sitikolin adalah meningkatkan sintesis fosfatidilkolin dan meningkatkan produksi asetilkolin (Gupta *et al.*, 2003). Sitikolin memiliki tiga mekanisme aksi yaitu memperbaiki membran neuronal melalui peningkatan sintesis fosfatidilkolin, lalu perbaikan membran neuronal kolinergik yang rusak melalui potensiasi produksi asetilkolin dan pengurangan produksi asam lemak bebas pada lokasi kerusakan saraf (Pathan *et al.*, 2012) sehingga dapat mencegah terjadinya demensia pada model hewan uji.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dapat disimpulkan bahwa ekstrak pegagan berpotensi mencegah ekspresi gen caspase 8 di sel piramidal tikus model demensia yang diinduksi TMT

Saran

Penelitian lebih lanjut diperlukan dengan menggunakan prosedur perhitungan jumlah sel yang mengekspresikan gen caspase 8 yang non bias, misalnya menggunakan metode stereologi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Ahmad Dahlan yang telah mendanai penelitian ini dalam program penelitian regular skema Penelitian Dasar dengan nomor surat perjanjian penelitian PD-054/SP3/LPPM-UAD/2020

DAFTAR PUSTAKA

Akbar, M. F. (2019). Efek ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi Bcl-2 di sel piramidal hippocampus pada tikus model demensia yang diinduksi trimetiltin. *Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Ahmad*

Dahlan.

- Alvarez-Sabin, J., & Roman, G. C. (2011). Citicoline in vascular cognitive impairment and vascular dementia after stroke. In *Stroke* (pp. S40–S43).
- Billingsley, M. I., Yun, J., Reese, B. e., Davidson, C. e., Buck-Koehntop, B. a., & Veglia, G. (2006). Functional and structural properties of stannin: *Roles in Cellular Growth, Selective Toxicity, and Mitochondrial Responses to Injury.*, 98(*J.Cell.Biochem*), 243–250.
- Buck, B.A., Mascioni, A., Cramer, C.J., & Veglia, G. (2004). Interactions of alkyltin salts with biological dithiols: *Dealkylation and Induction of a Regular Betaturn Structure in Peptides.*, 126(*J. Am. Chem. Soc.*), 14400–14410.
- Davidson, C.E., Reese, B.E., Billingsley, M.L., & Yun, J. K. (2004). Stannin, A Protein That Localizes to the Mitochondria and Sensitizes NIH-3T3 Cells to Trimethyltin and Dimethyltin Toxicity. In *Mol. Pharmacol.*66 (pp. 855–863).
- Fukui, K., Omoi, N.-O., Hayasaka, T., Shinnkai, T., Suzuki, S., Abe, K., & Urano, S. (2002). Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959, 275–284.
- Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. In *Wiad. Lek. Wars. Pol* (pp. 453–455).
- Geloso, M.C., Vercelli, A., Corvino, V., Repici, M., Boca, M., Haglid, K., Zelano, G., & Michetti, F. (2002). *Cyclooxygenase-2 and Caspase 3 Expression in Trimethyltin-Induced Apoptosis in the Mouse Hippocampus.* 175(*Exp. Neurol*), 152–160.
- Gupta, Y.K., Kumar, M.H.V., & Srivastava, A. K. (2003). Effect of *Centella asiatica* on pentylene tetrazole-induced kindling, cognition and oxidatives

- stress in rats. In *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*. (pp. 579–585).
- Guyton, A.C., & Hall, J. E. (2006). Textbook of Medical Physiology. 11th ed. Philadelphia. P.A. U.S.A. In *Elsivier Saunders*.
- Hattori, N., Ohta, S., Sakamoto, T., Mishima, S., & Fukurawa, S. (2011). No Title. *Royal Jelly Facilitates Restoration in Rat Hippocampus Following Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME). Neurotox. Res.* 3, 307-319, 3(Neurotox Res), 307–319.
- Liu, J., A. Wang, L.Li, Y. Huang, P. X. & A. H. (2010). *Oxidative Stress Mediates Hippocampal Neuron Death in Rats After Lithium-Pilocarpine-Induced Status Epilepticus*. 19(Seizure), 165–172.
- O'Brien M.A, K. R. (2008). Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care*, 18(6), 572–585.
- Palipoch S, K. P. (2015). *Oxidative stress-associated pathology: a review*. *Sains Malaysiana*. 44(10), 1441–1451.
- Pathan, A., Doijad, R., & Pawar, N. (2012). Therapeutic Applications of Citicoline and Piracetam as Fixed Dose Combination. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science*.
- Prakash, V., Jaiswal., & Srivasta, M. (2017). *A review on medicinal properties of Centella asiatica*, *Asian J Pharm Clin Res*. 10(10), 69–74.
- Robertson, DG., Grat, R.H., & Lalglesisa, F. A. D. (1987). Quantitative Assessment of Trimethyltin Induced Pathology of Hippocampus. *Toxicol, Pathol*, 15, 7–17.
- Sutherland, R.J., Whishaw, I.Q., & Kolb, B. (1983). A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. In *Behav. Brain Res.* 7 (pp. 133–153).
- Weinert, B.T., & Timiras, P. S. (2003). Invited review: *Theories of Aging*, 1985 95(J. Appl. Physiol, Bethesda), 1706–1716.
- Wong, RSY (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Onc Res*, 30(87), 1–14.
- Yuliani, S., Akbar., M.F., Rochmafihro, N., & Deslaila, L. (2021). *Effects of Centella asiatica L. On Spatial Memory and Bcl-2 Gene Expression in the Hippocampus of Rats Injected With Trimethyltin*. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 32(2), 141–149.
- Yuliani, S., Mustofa, & Partadiredja, G. (2018a). The neuroprotective effects of an ethanolic turmeric (*Curcuma longa* L.) extract against trimethyltin-induced oxidative stress in rat. *Nutritional Neuroscience*.
- Yuliani, S., Mustofa, & Partadiredja, G. (2018b). The neuroprotective effects of an ethanolic turmeric (*Curcuma longa* L.) extract against trimethyltin-induced oxidative stress in rat. *Nutritional Neuroscience*.
- Yuliani, S. & Sulistyani, N. (2018). Efek Herba Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Memori Spasial Tikus Model Demensia yang Diinduksi Trimethyltin. *Laporan Penelitian. LPPM. Universitas Ahmad Dahlan*.