

# Proceeding Book

## The 15<sup>th</sup> National Congress of Indonesian Society of Pharmacology

*"To Increase the Role of  
Pharmacology in Rational Therapy  
for Current Health Services"*

*Jakarta, October 20, 2016*



**The Indonesian Society of Pharmacology  
(IKAFI)**

## Level of IFN- $\gamma$ and Interleukin-10 In Tuberculosis Rat Models After Administration of *Centella asiatica* Extract

Arifa Mustika<sup>1</sup>, Roostantia Indrawati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Correspondence email: mustikaarifa@gmail.com

### Abstract

Evidence based of *Centella asiatica* as immunomodulator in tuberculosis diseases are unclear. Therefore, the further research of *Centella asiatica* as immunomodulator are necessary, through measuring the level of IFN- $\gamma$  and Interleukin-10. Twenty eight male rats infected with *Mycobacterium tuberculosis* through intratrachea. After 29 days post infection, rats were divided randomly into four groups. Groups 1,2, and 3 were groups that obtained the ethanol extract of *Centella asiatica* at 375 mg / kgBW, 750 mg / kgBW and 1500 mg / kgBW, during 14 days, peroral and fourth group was the control group that obtained only vehicle. The measurement of IFN- $\gamma$  and Interleukin-10 level were performed by ELISA on the day 15<sup>th</sup>. The results have shown that the highest mean level of IFN- $\gamma$  and The lowest mean level of Interleukin-10 is the group that obtained the ethanol extract of *Centella asiatica* at 750 mg / kgBW. In conclusion, the ethanol extract of *Centella asiatica* improve immune response of tuberculosis rat models, through increased IFN $\gamma$  level.

Keyword : *Centella asiatica*, *M.tuberculosis*, IFN $\gamma$ , Interleukin-10

## Kadar IFN- $\gamma$ Dan Interleukin-10 Pada Tikus Model Tuberculosis Setelah Pemberian Ekstrak *Centella asiatica*

### Abstrak

Bukti ilmiah tentang khasiat *Centella asiatica* sebagai imunomodulator untuk terapi pendamping pada tuberculosis masih belum banyak. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek ekstrak *Centella asiatica* terhadap respons imun pada tikus model tuberculosis melalui kadar sitokin IFN- $\gamma$  dan Interleukin-10. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental pada tikus dengan rancangan acak lengkap. Dua puluh delapan tikus jantan diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* secara intratrakeal. Pada hari ke-29 setelah infeksi, dua puluh empat tikus dibagi secara acak menjadi 4 kelompok. Kelompok 1, 2, dan 3 diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* dengan dosis 375mg/kgbb, 750mg/kgbb, 1500mg/kgbb, sekali sehari secara peroral selama 14 hari. Kelompok 4 adalah kelompok kontrol, diberi vehikulum. Pada hari ke- 15, tikus dikorbankan nyawanya untuk diambil darahnya secara intrakardial dan diperiksa kadar IFN- $\gamma$  dan Interleukin-10 dengan menggunakan metode ELISA. Hasil penelitian menunjukkan, rerata tertinggi kadar IFN $\gamma$  pada kelompok tikus yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* dengan dosis 750 mg/kgbb tikus. Rerata terendah kadar Interleukin-10 pada kelompok tikus yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* dengan dosis 750 mg/kgbb tikus. Kesimpulan dari penelitian adalah ekstrak etanol *Centella asiatica* memperbaiki respons imun tikus model tuberculosis melalui peningkatan kadar IFN $\gamma$

Kata kunci : *Centella asiatica*, *M.tuberculosis*, IFN $\gamma$ , Interleukin-10

## PENDAHULUAN

Tuberkulosis berawal dari inhalasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* ke dalam alveoli paru. Bakteri berikatan dengan reseptor fagosit yang terdapat diberbagai sel seperti alveolar makrofag, sel dendritik dan monosit yang masuk dari pembuluh darah. Makrofag dan sel dendritik mengkespresikan reseptor fagosit dan *toll like receptors* (TLR). Ikatan spesifik antara TLR dengan patogen akan menciptakan sebuah signal transduksi pada *host*. Sinyal ini akan mengaktifkan NF- $\kappa$ B, selanjutnya akan menginduksi sitokin dan kemokin (1). Jadi aktivasi TLR merupakan penghubung yang penting antara respons imun alami dengan respons imun selular. Oleh karena itu, respons imun terhadap *Mycobacterium tuberculosis* memegang peranan penting dalam hasil keluaran infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Bila seseorang terpapar bakteri tersebut maka keluaran penyakit tergantung respons imun individu tersebut. Bila respons imun tinggi, maka bakteri akan mati dan individu sehat. Bila respons imun sedang, maka individu tersebut akan mengalami infeksi laten, pembawa bakteri dan hanya 10% menjadi sakit (2).

Makrofag dianggap sebagai sel utama pada terjadinya infeksi tuberkulosis. Makrofag alveolar mempunyai peranan esensial untuk mengeliminasi organisme yang masuk ke dalam saluran napas. Makrofag merupakan sel yang pertama yang berinteraksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*. Interaksi awal antara bakteri dengan makrofag adalah melalui reseptor yang disebut Fc, komplemen, manose, protein surfaktan, dan CD43. Meskipun belum diketahui secara pasti jika bakteri berinteraksi dengan salah satu atau lebih reseptor tersebut tetapi secara *invitro* diketahui bahwa respons makrofag tergantung pada interaksi antara makrofag dengan salah satu reseptor. Interaksinya dengan Fc reseptor meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan menyebabkan fusi antara fagosom yang mengandung bakteri dan lisosom (3). Di sisi lain interaksi antara bakteri dengan reseptor C3 mencegah *respiratory burst* dan memblokir maturasi antara fagosom yang mengandung bakteri dengan mencegah fusi antara fagosom dengan lisosom. Interaksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan TLR-2 dan TLR-4 akan mengaktifkan berbagai komponen *Mycobacterium tuberculosis* seperti 19-kDa lipoprotein dan lipoarabinomannan (LAM) yang akan mengaktifkan makrofag melalui TLR-2 dan menginduksi IL-12 dan sintesis iNOS (1) (4).

Pada infeksi tubekulosis respons imun protektif lebih pada respons imun seluler daripada respon imun humoral yang memproduksi antibodi. *Mycobacterium tuberculosis* tinggal di dalam makrofag dan relatif resisten terhadap mekanisme mikrobisidal yang secara efisien mengeliminasi bakteri lain yang difagositosis. Hal ini merupakan bagian dari kemampuan bakteri tersebut untuk menghindari aktivasi makrofag oleh IFN- $\gamma$  dan IL-12 (5, 6) Berbagai studi menunjukkan bahwa sitokin tersebut memegang peranan kritis pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis* baik pada manusia maupun pada hewan. Defisiensi dari IFN- $\gamma$  dan IL-12 atau reseptornya menyebabkan individu lebih rentan terhadap infeksi tersebut. Lebih dari 20 tahun diasumsikan bahwa induksi sel Th1 menghasilkan respons imun yang protektif terhadap infeksi tuberkulosis (4).

Respons imun yang paling menentukan pertahanan tubuh terhadap bakteri adalah respons imun seluler yang diperankan oleh makrofag. Secara umum makrofag akan memfagositosis mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh dan selanjutnya dihambat pertumbuhannya dan dibunuh. *macrophages intracellular killing Mycobacterium tuberculosis* ini sangat mempengaruhi perkembangan mikroorganisme dan manifestasi kliniknya. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* memiliki kemampuan untuk menghindar dari kemampuan daya bunuh intraseluler makrofag dan tetap hidup dan berkembang biak di dalam makrofag. Hal ini juga menyebabkan bakteri tersebut mampu menghindar dari berbagai antibiotik. Kemampuan makrofag untuk membunuh *Mycobacterium tuberculosis* tergantung dari aktivasi oleh sel efektor lainnya melalui produksi sitokin. Berbagai penelitian telah

membuktikan bahwa aktivasi makrofag tergantung oleh interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) dan transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) (7). IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  merupakan sitokin activator makrofag dan TGF- $\beta$  merupakan deaktivasi makrofag untuk membunuh *M. tuberculosis* intraseluler. Beberapa penelitian baik secara invitro maupun invivo pada hewan coba menunjukkan bahwa pemberian tuberculin akan menurunkan produksi IFN- $\gamma$  dan menginduksi TGF- $\beta$ . Demikian juga penelitian pada penderita tuberkulosis menunjukkan penurunan IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 (8) Pada penelitian lainnya, TNF- $\alpha$  juga mampu meningkatkan produksi nitrit oxide oleh makrofag (4). Ketidakseimbangan sitokin menyebabkan kemampuan daya bunuh makrofag menurun. Hal ini dapat dilihat dari menurunnya *reactive oxygen intermediate* dan nitrit oxide yang dihasilkan oleh makrofag yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* (9, 10).

Fenomena ini menunjukkan bahwa eliminasi *Mycobacterium tuberculosis* ditentukan oleh respon imun seluler yang diperankan oleh makrofag dan sitokin yang merangsang atau menghambat aktivitas makrofag.

Ekstrak metanol *Centella asiatica* telah dibuktikan sebagai imunomodulator pada tikus dengan cara meningkatkan ekspresi dari CD4, CD8, makrofag, imunoglobulin G, M dan A. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak tersebut dapat mempengaruhi respons imunologi baik humoral maupun seluler. Pada penelitian ini mengungkapkan bahwa terdapat perbedaan modulasi respons imun antara ekstrak metanol *Centella asiatica* (EMCA) dengan tablet yang hanya mengandung *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecaside* (FTECA). EMCA memodulasi respons imun melalui presentasi oleh molekul MHC kelas II sedangkan FTECA memodulasi respons imun melalui MHC kelas I (3, 11).

Ekstrak etanol *Centella asiatica* (pegagan) juga dibuktikan meningkatkan produksi imunoglobulin G mencit (12). Peneliti lain juga membuktikan bahwa ekstrak tumbuhan tersebut meningkatkan kadar IFN- $\gamma$  secara bermakna pada makrofag terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan meningkatkan produksi TNF- $\alpha$  tetapi tidak bermakna secara statistik (13). Peneliti lain juga menunjukkan peningkatan titer antibodi pada pemberian ekstrak tumbuhan tersebut pada mencit (14). Ekstrak air dan etanol *Centella asiatica* mampu meningkatkan kadar TNF- $\alpha$  pada sel kultur makrofag sehat (15). *Centella asiatica* juga terbukti tidak bersifat toksik dan memiliki khasiat hepatoprotektif pada hewan coba tikus yang diinduksi dengan *carbon tetrachloride* (16).

Sampai saat ini bukti ilmiah tentang khasiat *Centella asiatica* terutama pada hewan coba yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* masih belum banyak data yang dikumpulkan. Hal ini tentu saja menimbulkan keraguan baik oleh masyarakat maupun tenaga medis untuk memanfaatkan tanaman tersebut sebagai terapi pendamping tuberkulosis. Untuk meningkatkan penggunaan tanaman obat *Centella asiatica* menjadi obat fitofarmaka sebagai imunomodulator pada infeksi tuberkulosis, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak *Centella asiatica* terhadap respons imun seluler pada tikus yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tentang pengaruh ekstrak *Centella asiatica* terhadap respons imun seluler pada tikus yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* melalui kadar sitokin IFN- $\gamma$  dan IL-10.

## MATERI DAN METODE

### MATERI

#### *Centella asiatica*

Tanaman yang digunakan adalah seluruh tumbuhan *Centella asiatica* yang diperoleh dari Balai Materia Medika Batu.

#### Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah Rattus Norvegicus dengan jenis kelamin jantan dan berat badan antara 125 – 200 gram.

#### Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah, tikus ratus norwegicus, simplisia *Centella asiatica*, alcohol 70%, aquadestilata, carboxy methyl cellulose natrium (CMC Na), tween 80, bakteri *M. tuberculosis*, ketamin HCl, Xalasin, pakan tikus, dan elisa kit untuk IFN  $\gamma$  dan Interleukin 10 (no catalog RIF00).

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba, peralatan bedah minor, sonde, spuit 1 cc, spuit 5cc, spuit 10 cc, vacuum, waterbath, mortar stamper, vacutainer, tabung sntrifuge, tube 2 cc, mikropipet, Elisa washing, and Elisa reader.

#### METODE

##### Ekstraksi *Centella asiatica*

Metode ekastraksi *Centella asiatica* adalah maserasi dengan menggunakan pelarut alcohol 70%. Dosis ekstrak etanol *Centella asiatica* adalah jumlah ekstrak etanol *Centella asiatica* yang diberikan pada tikus sesuai dengan berat badan secara peroral satu kali sehari selama 14 hari. Dosis ekstrak etanol centella asiatica adalah 375mg/KgBB, 750mg/KgBB dan 1500mg/kgBB

##### Model infeksi tikus

Pembuatan model infeksi tikus dengan *M. tuberculosis* sesuai dengan tata cara yang telah dilakukan oleh Mustika (17)

#### Pemeriksaan kadar IFN- $\gamma$ dan IL-10 dalam serum darah tikus

Pemeriksaan kadar IFN- $\gamma$  dan IL-10 dalam serum darah tikus dengan menggunakan Metode ELISA. Darah tikus yang diambil dari jantung, didiamkan dalam suhu kamar sampai terbentuk bekun, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Serum yang diperoleh dilakukan pemeriksaan kadar dengan menggunakan metode ELISA.

#### Laik Etik

Prosedur penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan No : 129-KE

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

##### Hasil pemeriksaan efek ekstrak etanol *Centella asiatica* terhadap kadar IFN $\gamma$ pada serum darah tikus yang diinfeksi dengan *M.tuberculosis*

Pemeriksaan kadar IFN $\gamma$  pada serum darah tikus dilakukan dengan menggunakan metode ELISA. Hasil pemeriksaan kadar IFN $\gamma$  pada serum darah tikus dapat dilihat pada tabel 1. Rerata tertinggi kadar IFN $\gamma$  ada pada kelompok tikus yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* dengan dosis 750 mg/kgbb tikus. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat erbedaan yang bermakna antara kelompok yang tidak memperoleh ekstrak dengan kelompok yang memperoleh ekstrak dengan dosis 750 mg/kgbb. Perbedaan yang bermakna juga ditunjukkan antara kelompok yang memperoleh ekstrak etanol dosis 375 mg/kgbb dan 1500 mg/kgbb dengan dosis 750 mg/kgbb

Tabel 1 Kadar IFN $\gamma$  pada serum darah tikus

DOSIS	KADAR IFN $\gamma$
375 mg/kg	1 154,2

	2	123,9
	3	204,4
	4	189,9
	5	193,8
	6	180,6
750 mg/kgbb	1	155,5
	2	678,4
	3	180,6
	4	694,3
	5	174,0
	6	146,3
1500 mg/kgbb	1	174,0
	2	146,3
	3	172,7
	4	146,3
	5	218,9
	6	163,5
0 mg/kgbb	1	168,7
	2	139,7
	3	185,9
	4	184,6
	5	182,0
	6	158,2

Tabel 2. Rerata dan simpangan baku kadar IFN $\gamma$  pada serum darah tikus

Dosis	Rerata	Simpangan baku
0 mg/kg	172,9 <sup>a</sup>	12,8
375 mg/kg	174,5 <sup>a</sup>	30
750 mg/kg	338,18 <sup>b</sup>	270,02
1500 mg/kg	168,30 <sup>a</sup>	27,95

Keterangan : superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna

Peningkatan dosis ekstrak etanol *Centella asiatica*, tidak diikuti dengan peningkatan kadar IFN $\gamma$  pada serum darah tikus. Bila dibandingkan antara kelompok yang tidak memperoleh ekstrak dengan yang memperoleh ekstrak, terdapat peningkatan kadar IFN $\gamma$  dari dosis 375 mg/kgbb ke dosis 750 mg/kgbb. Pada dosis 1500 mg/kgbb kadar IFN $\gamma$  justru mengalami penurunan. Data ini menunjukkan bahwa dosis optimum untuk memicu peningkatan kadar IFN $\gamma$  ada pada dosis 750 mg/kgbb, sedangkan pada dosis 1500 mg/kg terjadi penurunan kemungkinan disebabkan karena efek dari *down regulation* atau umpan balik negatif.

**Hasil pemeriksaan efek ekstrak etanol *Centella asiatica* terhadap kadar IL-10 pada serum darah tikus yang diinfeksi dengan *M.tuberculosis***

Pemeriksaan kadar IL-10 pada serum darah tikus dilakukan dengan menggunakan metode ELISA. Hasil pemeriksaan kadar IL-10 pada serum darah tikus dapat dilihat pada tabel 3. Rerata terendah kadar IL-10 ada pada kelompok tikus yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* dengan dosis 750 mg/kgbb tikus. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok yang tidak memperoleh ekstrak dengan kelompok yang memperoleh ekstrak. Walaupun demikian, rerata menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Centella asiatica* menurunkan kadar IL 10 bila dibandingkan dengan rerata pada kelompok yang tidak memperoleh ekstrak. Pada dosis 375 mg/kgbb, rerata yang didapat sebanding dengan rerata pada kelompok control, sedangkan pada dosis 1500 mg/kgbb justru terjadi peningkatan kadar IL 10. Data ini menunjukkan bahwa pada dosis tertentu ekstrak etanol *Centella asiatica* mempunyai kemungkinan untuk menghambat respons imun seluler.

Tabel 3 Kadar IL 10 pada serum darah tikus

DOSIS	KADAR IL 10
375 mg/kg	1 139,7
	2 118,6
	3 193,8
	4 148,9
	5 170,1
	6 182,0
750 mg/kgbb	1 156,9
	2 145,0
	3 135,7
	4 142,3
	5 172,7
	6 142,3
1500 mg/kgbb	1 162,1
	2 142,3
	3 170,1
	4 139,7
	5 133,1
	6 976,8
0 mg/kgbb	1 156,9
	2 147,6
	3 166,1
	4 162,1
	5 163,5
	6 150,3

Tabel 4. Rerata dan simpangan baku kadar IL-10 pada serum darah tikus

Dosis	Rerata	Simpangan baku
0 mg/kg	157.7500 <sup>a</sup>	7.49607
375 mg/kg	158.8500 <sup>a</sup>	28.17721
750 mg/kg	149.1500 <sup>a</sup>	13.4657
1500 mg/kg	287.3500 <sup>a</sup>	338.05606

Keterangan : superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna

#### KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian adalah ekstrak etanol *Centella asiatica* meningkatkan kadar IFN $\gamma$  dan tidak mempengaruhi kadar IL 10 pada tikus yang diinfeksi dengan *M.tuberculosis*

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Prof.Dr.Agung Pranoto,dr.,M.Kes.,Sp.PD,K-EMD,FINASIM sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Periode 2010 -2015 dan Prof. Dr. Soetojo,dr.,Sp.U(K) sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Periode 2015-2020 yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dana sehingga penelitian ini dapat terlaksana dan dipublikasikan pada seminar nasional.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Dulfary Sánchez a b, Mauricio Rojas a b, Israel Hernández a, Danuta Radzioch c, Luis F. García a b, Barrera LF. Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage death. Cellular Immunology 2010;260:128–36.
2. BHATT K, PADMINI SALGAME1. Host Innate Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. Journal of Clinical Immunology. 2007;27.
3. Raja A. Immunology of tuberculosis. INDIAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH. 2004;120(4):213-32.
4. Adolfo Ro-BVc, Victoria C-Pa, Diana A-Ln, Ricardo LL, Antonio M-RoM, Jos M, et al. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. Eur J Immunol. 2006;36.
5. Herbst S, Schaible UE, Schneider BE. Interferon Gamma Activated Macrophages Kill Mycobacteria by Nitric Oxide Induced Apoptosis. PLoS ONE. 2011;6(5):e19105.
6. Ates Ö, Topal-Sarikaya A, Ongen G, Musellim B. Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphisms in Tuberculosis. Journal of Clinical Immunology. 2008;28(3):232-6.
7. Wan Y, Chen L, Xing Z, Yang T, Santosuosso M, Inman M, et al. TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. Journal of Clinical Investigation [NLM - MEDLINE]. 2004;113(3):401-13.
8. Schluger NW. The Pathogenesis of Tuberculosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2005;32:251-6.
9. Schluger NW. The Pathogenesis of Tuberculosis: The First One Hundred (and Twenty-Three) Years. American journal of respiratory and critical care medicine. 2005;32.
10. Sato K, Akaki T, Tomioka H. Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-production ability of murine peritoneal macrophages activated by



- interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ). *Clin Exp Immunol.* 1998;112:63-8.
11. Gonzalez-Juarrero M, Henao-Tamayo M, Ordway DJ, Kingry LC, Harton M, Basaraba RJ, et al. Immune Response to Mycobacterium tuberculosis and Identification of Molecular Markers of Disease. *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY.* 2009;40(4):398-409.
  12. Gitawati R, Astuti Y, Winarno W. Herba pegagan (centella asiatica L): Studi pendahuluan efek anti mikobakterium secara invitro. *Jurnal bahan Alam Indonesia* 2005;4(2):286-91.
  13. Mustika A, Indrawati R. EXTRACTS ETHANOL OF Centella asiatica ENHANCE INTERFERON- $\gamma$  AND TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$  IN MACROPHAGE CULTURE INFECTED BY Mycobacterium tuberculosis. *Prosiding 24th Federation of Asian Pharmaceutical Conggres.* 2012.
  14. Fatmasari A, Immaculata I. Efek Immunostimulasi Ekstrak Air Herba Pegagan (Centella asiatica Urb.) dan Daun Beluntas (Pluchea indica Less.) pada Mencit Swiss Webster Betina: Institute Technology Bandung; 2007.
  15. Vinitketkumneun U, Wild C, Punturee K. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in J774.2 mouse macrophages. *Journal of Ethnopharmacology.* 2004;95(2-3):183-9.
  16. Anthony A, G S, B M, V S, J M. Hepatoprotektif effect of centella asiatica (L) in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2006;68(6):772-6.
  17. Mustika A, Rahaju AS, Indrawati R. PENURUNAN TINGKAT KERUSAKAN JARINGAN PARU TIKUS TERINFEKSI M. TUBERCULOSIS OLEH EKSTRAK PEGAGAN MELALUI PENINGKATAN EKSPRESI TISSUE INHIBITOR of MATRIX METALLOPROTEINASE-1. *Jurnal Veteriner.* 2014;15(4).