
**EKSTRAK ETANOL DAUN SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA*)
MENURUNKAN HAI (*HISTOLOGY ACTIVITY INDEKS*)-*KNODELL SCORE* PADA
HEPAR MENCIT (*MUS MUSCULUS*) JANTAN YANG DIINDUKSI CCl_4**

Gede Gunawan Mahardika¹, Ni Wayan Sucindra Dewi², IGM. Aman²

¹Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

²Departemen Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Koresponding : Gede Gunawan Mahardika

Email : secretperson17011997@gmail.com

ABSTRAK

Hepatitis adalah semua jenis peradangan pada hepatosit (sel-sel hati), yang disebabkan oleh : infeksi (virus, bakteri, parasit), obat-obatan, konsumsi alkohol, zat toksik dan penyakit autoimun. Karbon tetraklorida adalah zat yang dapat menginduksi terjadinya hepatitis. Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) mengandung flavonoid dan *andrographolide* yang berpotensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek hepatoprotektif ekstrak daun Sambiloto terhadap hepar mencit yang diinduksi karbon tetraklorida dosis toksik yang dinilai dengan menggunakan *Knodell Score*. Rancangan penelitian adalah *post test only control group* dengan 28 sampel mencit (*Mus musculus*) jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok: P1 diberikan karbon tetraklorida (0,5 ml/kgBB) , P2 diberi ekstrak daun Sambiloto (50mg/kgBB/hari), P3 (100mg/kgBB/hari) dan P4 (200mg/kgBB/hari). Ekstrak diberikan selama 7 hari penelitian dan pada 8 jam setelah pemberian ekstrak terakhir, semua mencit diberikan CCl_4 dosis toksik. Pada hari ke-8 dilakukan terminasi dan penilaian histopatologis hepar. Data dianalisis dengan *One Way ANOVA* dan *Post Hoc LSD*. Diperoleh perbedaan skor yang signifikan antara kelompok yang hanya diberikan karbon tetraklorida dosis toksik dengan kelompok yang diberikan ekstrak. Dosis optimal adalah 200mg/kgBB/hari. Terjadi efek perbaikan skor histopatologi hepar dengan pemberian ekstrak daun Sambiloto pada mencit yang diinduksi karbon tetraklorida dosis toksik. Diperlukan penelitian yang lebih *advance* untuk mengetahui dosis efektif dan efek toksik pemberian ekstrak daun Sambiloto.

Kata Kunci: Ekstrak Etanol Daun Sambiloto, *HAI (Histology Activity Indeks)-Knodell Score*, Hepatoprotektif, Mencit (*Mus musculus*), Karbon Tetraklorida

ABSTRACT

Hepatitis is all types of inflammation in hepatocytes (liver cells), which caused by: infections (viruses, bacteria, and parasites), drugs, alcohol consumption, toxic substances and autoimmune diseases. Carbon tetrachloride can induce hepatitis. Sambiloto leaves (*Andrographis paniculata*) contains of flavonoids and *andrographolide* which have the potential as antioxidants. The aims of this study is to determine the hepatoprotective effect of Sambiloto leaves extract on mice liver that induced by tetrachloride carbon of toxic dose and evaluate using *Knodell Score*. The design of this study is a post-test only group control on 28 sample of male mice (*Mus musculus*) which divided into 4 groups; P1 given tetrachloride carbon (0.5,1/kgBB), P2 group was given Sambiloto leaves extract (50mg/kgBB/day), P3(100mg/kgBB/day) and P4 (200mg/kgBB/day). Extract was given during seven days and eight hour after last administration, all

mice was given CCl₄ toxic dose. On the eight day, the mice was terminated and examine the liver histopathological. Data analysed using One Way ANOVA and Post Hoc LSD. Significant score difference was found between the groups than only given tetrachloride carbon toxic dose and the group that given the extract. The optimal dose is 200mg/kgBB/day. There was an improvement effect of liver histopathology score by giving sambiloto leaves extract to mice that induced by tetrachloride carbon toxic dose. More advanced research is needed to determine the effective dose and toxic effects of giving sambiloto leaf extract.

Keywords: Ethanol Extract of Sambiloto Leaf, HAI (Histology Activity Indeks)-Knodell Score, Hepatoprotectif, Mice (*Mus musculus*), Tetrachloride Carbon

PENDAHULUAN

Hepatitis adalah semua jenis peradangan pada hepatosit (sel-sel hati), yang bisa disebabkan oleh: infeksi (virus, bakteri, parasit), obat-obatan, konsumsi alkohol, lemak yang berlebih dan penyakit autoimun. Hepatitis virus adalah bentuk hepatitis yang paling sering terjadi. Ada 5 jenis hepatitis virus, yaitu A, B, C, D, dan E. Hepatitis A dan E adalah hepatitis yang bersifat akut dan dapat sembuh dengan baik, serta berhubungan dengan pola perilaku hidup bersih dan sehat sedangkan hepatitis B, C, dan E memiliki potensi kronis dan dapat menimbulkan sirosis dan kanker hati.¹

Hepatitis B dan C merupakan yang paling sering terjadi dengan jumlah kasus 2 miliar orang terinfeksi hepatitis B dan 170 juta orang terinfeksi hepatitis C di dunia. Tercatat 1,5 juta penduduk di dunia meninggal karena hepatitis setiap tahunnya. Indonesia merupakan negara endemisitas tinggi hepatitis B setelah Myanmar di Asia Tenggara. Diperkirakan 10 dari 100 orang terinfeksi hepatitis B atau C. Jadi diperkirakan 28 juta penduduk terinfeksi Hepatitis B dan C, 50 persennya berpotensi menjadi kronis.¹

Kejadian hepatitis juga diinduksi oleh beberapa jenis zat kimia salah satunya CCl₄ (*carbon tetrachloride*). CCl₄ adalah senyawa yang digunakan sebagai zat pendingin dan propelan kaleng aerosol. Pada penelitian tentang toksisitas CCl₄, 147 dari 424 laporan bahwa CCl₄ memicu hepatitis. Morfologi hepatitis yang disebabkan oleh CCl₄ mirip dengan yang ditimbulkan oleh hepatitis virus karena memicu proses kerusakan sel dan menginduksi proses *cell repair* sehingga menimbulkan fibrosis.²

Tingginya angka kejadian hepatitis di masyarakat dan efeknya pada hepar yang bisa fatal mendorong banyaknya penelitian yang berfokus pada tanaman alternatif yang umum digunakan dan mudah didapatkan di masyarakat serta dipercaya memiliki potensi toksisitas yang kecil. Salah satu tanaman alternatif yang digunakan adalah sambiloto (*Andrographis paniculata*). Telah dibuktikan bahwa tanaman tersebut memiliki banyak manfaat salah satunya sebagai hepatoprotektor.³

Kandungan zat aktif pada sambiloto (*Andrographis paniculata*) memiliki banyak manfaat.

Andrographolide berperan sebagai anti-kanker dan *hepatoprotector agent*. Selain itu ada juga senyawa lain yaitu *14-deoxyandrographolid* sebagai induktor dalam proliferasi *IL-2*, *12-dehidroxyandrographolide* sebagai anti-kanker, *14-deoxy-11-oxoandrographolide* sebagai anti parasit, *Neoandrographolide* sebagai anti-inflamasi, *Kalmerghin* sebagai obat demam, dan *Andrographiside* sebagai *anti-oxidant*, *Carcinogenic Detoxification*, dan *Anti-Lipoperoxidant*.³⁻⁷

Andrographolide adalah senyawa aktif yang memiliki peran sebagai agen hepatoprotektor. Senyawa ini memiliki peran penting dalam proteksi hepar sebagai antioksidan yaitu dengan menurunkan hasil produksi *lipid peroxidation* yaitu *malondialdehyde* (MDA) serta mempertahankan kadar *gluthathione*, *glutamate piruvat transaminase* dan *alkaline fosfatase*. Selain fungsi itu, adapun fungsi lain yang berhubungan dengan fungsi hepatoprotektor yaitu menghinibisi produksi radikal bebas di neutrophil⁸, menghinibisi migrasi makrofag, inhibisi aktivitas NF-kB, inhibisi produksi TNF- α dan *IL-2*. Dari banyak fungsinya, sebagian besar kerja *Andrographolide* sebagai inhibitor respon inflamasi.⁷⁻¹²

Berdasarkan hal tersebut maka diduga pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) menekan proses nekrosis dan inflamasi dari hepatosit yang disebabkan oleh CCl₄. Untuk menilai kerusakan histopatologis hepar, salah satu metode yang digunakan untuk menilai adalah *HAI (Histology Activity Indeks)-Knodell Score*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini adalah penelitian laboratorium eksperimental dengan rancangan *post-test only control group*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Terpadu FK Udayana pada bulan Februari hingga September 2018. Subjek penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) yang memenuhi kriteria yaitu berumur 2-3 bulan, berjenis kelamin jantan, dan memiliki berat 25-30 gram.

Jumlah mencit yang digunakan dihitung menggunakan rumus Federer dengan 4 kelompok perlakuan sehingga total pengulangan per kelompok menjadi 6 ekor. Untuk mengantisipasi adanya kondisi

drop out maka ditambah 10% dari pengulangan sehingga total mencit yang digunakan menjadi 28 ekor

Mencit dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. P1 diberikan CCl_4 dosis toksik (0,5 mg/kg/BB), P2 diberikan ekstrak etanol daun Sambiloto 50 mg/kgBB/hari, P3 diberikan ekstrak etanol daun Sambiloto 100 mg/kgBB/hari, dan P4 diberikan ekstrak etanol daun Sambiloto 200 mg/kgBB/hari. Ekstrak diberikan selama 7 hari dan pada 8 jam setelah pemberian ekstrak terakhir, semua mencit diberikan CCl_4 dosis toksik dan 24 jam setelah pemberian CCl_4 , mencit di terminasi dan diambil organ heparnya kemudian dinilai HAI (*Histology Activity Index*)-*Knodell Score*. Hasil yang didapat akan dianalisis menggunakan software IBM SPSS Statistics 21.

Penelitian ini telah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan surat kelaikan etik nomor 1639/UN14.2.2/PD/KEP/2018.

HASIL

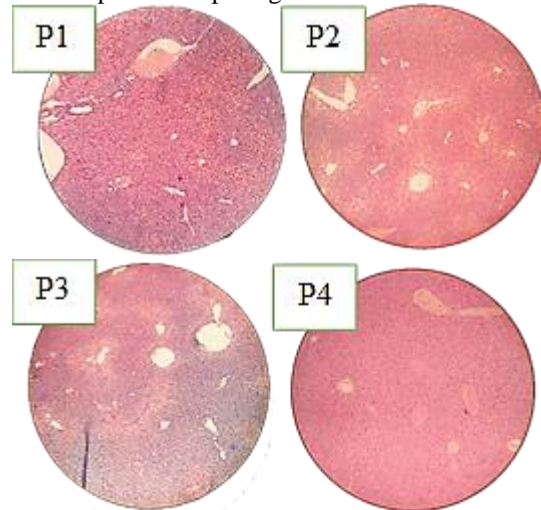
Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, diperoleh data yang menunjukkan kerusakan pada hepar mencit dari pemberian karbon tetraklorida dosis toksik pada setiap perlakuan tersedia pada tabel 1. Berdasarkan hasil uji normalitas didapatkan data dengan nilai $P > 0,05$ yang menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Hasil dari uji homogenitas juga diperoleh $P > 0,05$ yang menunjukkan bahwa data homogen. Selanjutnya data dianalisis dengan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rerata tiap perlakuan yang didapatkan adalah bermakna. Diperoleh rerata HAI (*Histology Activity Indeks*)-*Knodell Score* pada kelompok P1 yakni $0,74 \pm 0,069$. Berdasar data pada tabel di bawah ini diperoleh HAI (*Histology Activity Indeks*)-*Knodell Score* pada kelompok P1 dibandingkan dengan kelompok P2, P3, dan P4. Selain itu diperoleh beda rerata yang bermakna antara perlakuan yang diberikan ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dengan perlakuan kontrol negatif yang hanya diberikan CCl_4 dosis toksik (tersedia pada gambar 1 dan 2).

Tabel 1 : Skor kerusakan histopatologis HAI (*Histology Activity Indeks*)-*Knodell Score*

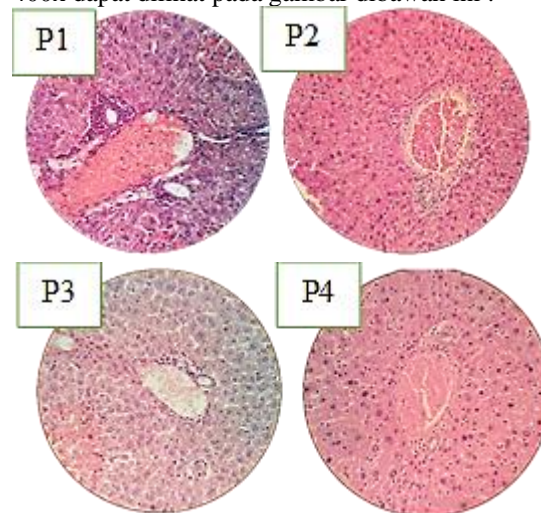
No	Perlakuan	Rerata (n=7) ± s.d.
1	P1 : CCl_4 dosis toksik	$0,74 \pm 0,069^{(a)}$
2	P2 : ekstrak 50mg/kgBB/hari	$0,31 \pm 0,207^{(b)}$
3	P3 : ekstrak 100mg/kgBB/hari	$0,38 \pm 0,293^{(b)}$
4	P4 : ekstrak 200mg/kgBB/hari	$0,13 \pm 0,078^{(c)}$

Keterangan: a=P1 signifikan terhadap semua kelompok perlakuan, b =P2 tidak signifikan terhadap P3, c= P4 signifikan terhadap semua kelompok.

Gambar 1 : Pemeriksaan histopatologi hepar mencit dengan pengecatan Hematoksilin-Eosin dan perbesaran 100x dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 2 : Pemeriksaan histopatologi hepar mencit dengan pengecatan Hematoksilin-Eosin dan perbesaran 400x dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, peneliti memperoleh terjadi peningkatan skor kerusakan hepar berdasarkan pada HAI (*Histology Activity Indeks*)-*Knodell Score* lebih dominan terjadi pada pemberian CCl_4 dosis toksik pada hewan coba. Selain itu, hasil penelitian ini juga menunjukkan adanya perbedaan rerata yang signifikan pada kelompok P1 yang hanya diberikan CCl_4 dosis toksik dengan kelompok P2, P3 dan P4. Hasil ini menunjukkan adanya efek

hepatoprotektif pada ekstrak etanol daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*). Hasil ini didukung oleh penelitian Ju-Feng Ye yang secara signifikan menurunkan nekrotik area dan jumlah sel yang mengalami inflamasi. Efek hepatoprotektif pada ekstrak daun Sambiloto ini belum dapat 100% melindungi hepar. Hal ini dapat terjadi karena efek hepatotoksik yang lebih kuat atau dosis ekstrak daun Sambiloto yang diberikan belum dalam dosis yang efektif.¹⁵

Berdasarkan hasil analisis, ada perbedaan signifikan antar kelompok setiap konsentrasi pemberian ekstrak daun Sambiloto, pada 200 mg lebih baik dari 100 mg dan 50 mg, namun tidak ada perbedaan signifikan antara konsentrasi 100 mg dan 50 mg, hasil ini mengindikasikan bahwa dosis optimal ekstrak daun Sambiloto adalah 200 mg/kgBB/hari.

Hepatic injury yang disebabkan oleh CCl₄ disebabkan oleh overproduksi dari *triklorometil-free radical*, diikuti oleh proses inflamasi yang diinisiasi oleh Kuppfer sel. Kuppfer sel akan melepaskan berbagai macam mediator inflamasi atau sitokin, yang akhirnya mengarah ke liver injury.¹³ Ketika terjadi kerusakan jaringan, memicu aktivasi makrofag yang menyebabkan overproduksi dari TNF- α sehingga memicu nekrosis hepatis.¹⁴ Pada penelitian ini, kelompok yang mendapatkan CCl₄ dosis toksik, kadar TNF- α nya mengalami peningkatan sehingga terjadi inflamasi dan nekrosis, namun pemberian ekstrak daun Sambiloto secara signifikan menurunkan sehingga efek nekrosis dan inflamasi menjadi berkurang.¹⁵

Selain TNF- α , ekspresi Heme oxygenase-1 (HO-1) juga berperan. Ekspresi (HO-1) diinduksi oleh heme, *heavy metals*, *cytokines*, dan *chemical karsinogen*. HO-1 memiliki peran penting melawan stress oksidatif.¹⁶ Dilaporkan bahwa administrasi CCl₄ memicu peningkatan signifikan ekspresi HO-1. Pada studi ini, kemungkinan CCl₄ meningkatkan ekspresi HO-1. Pemberian ekstrak etanol daun Sambiloto meningkatkan ekspresi HO-1 sebagai umpan balik tubuh dalam menurunkan *hepatic injury*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa efek hepatoprotektif dari daun Sambiloto yang diinduksi CCl₄ berhubungan dengan TNF- α dan ekspresi HO-1. HO-1 akan mendegradasi heme menjadi biliverdin, CO dan iron bebas.¹⁷ Biliverdin akan diubah menjadi bilirubin oleh *NADPH reductase*. Hasil reaksi ini memiliki efek biologis yang penting. Bilirubin akan menjadi pemangsa dari ROS sehingga dapat melindungi sel dari *oxidative injury*. CO memiliki banyak fungsi biologis, seperti anti-inflamasi dan anti-apoptosis melawan oksidan yang dihasilkan dari proses inflamasi. *Iron* yang dilepaskan oleh HO-1, meningkatkan sintesis ferritin, yang berperan sebagai anti oksidan yang efektif dan pertahanan melawan *lipid-peroxidation*.¹⁸

Flavonoid menunjukkan aktivitas antioksidan secara in vivo maupun in vitro. Pada tanaman, MAPKs diaktifkan oleh stres oksidatif dan berfungsi sebagai mediator terhadap stresor. Flavonoid memiliki potensi untuk mempengaruhi kaskade sinyal MPAK tidak hanya dengan mengikat langsung ke situs aktif dari protein, tetapi juga memodulasi aktivasi melalui mekanisme *ROS-scavenging*. Selain itu, antioksidan flavonoid memiliki pengaruh terhadap detoksifikasi ROS dalam sel tanaman, sedangkan pada sel manusia, fungsinya sebagai agen pereduksi memiliki nilai signifikansi yang relatif kecil. Namun, flavonoid memiliki fungsi yang sama pada tumbuhan dan manusia.¹⁹

Ekstrak daun Sambiloto mengandung 2 flavonoid penting yaitu *5,7,2',3'-tetramethoxyflavone* dan *5-hydroxy-7,2',3'-trimethoxyflavone*.²⁰ Flavonoid ini berperan sebagai hepatoprotektor dalam bentuk antioksidan yang memiliki pengaruh terhadap proses-proses stres oksidatif. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sheeja (2014) pemberian ekstrak daun Sambiloto mempengaruhi *Superoxide Scavenging Activity* dengan menurunkan 32% pembentukan *superoxide radical*. Radikal-radikal oksida nitrat yang dihasilkan dari natrium nitroprusside, 42,8% dihambat produksinya, sementara 100 μ g ekstrak menunjukkan 11,5% penghambatan dalam kondisi in vitro. Penghambatan pembentukan oksida nitrat juga menggunakan tikus in vivo dan menunjukkan 65,3% penghambatan produksi oksida nitrat. Degradasi deoksiribosa oleh radikal hidroksil yang dihasilkan dari Fe³⁺ EDTA-H₂O₂ ditemukan dihambat oleh pemberian ekstrak. Pada pemberian 25 μ g ekstrak menunjukkan 54% inhibisi produksi radikal, sementara 500 μ g / mL konsentrasi ekstrak ini menunjukkan 80% penghambatan radikal hidroksil. Pemberian ekstrak ditemukan menghambat lipid peroksida yang dihasilkan oleh induksi Fe²⁺/askorbat dan Fe³⁺/ADP/askorbat pada homogenat hati tikus. Pada pemberian 500 μ g ekstrak Daun Sambiloto menunjukkan 80% inhibisi dalam peroksidasi lipid, sedangkan 25 μ g ekstrak daun Sambiloto menunjukkan hanya 30% penghambatan. Hasil-hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun Sambiloto menghambat oksida nitrat, degradasi deoksiribosa dan peroksidasi lipid.²¹

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian di atas, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) dosis 200mg/kgBB/hari memiliki efek yang lebih baik dibandingkan dosis yang lebih rendah (50 dan 100mg/kgBB/hari) dalam mencegah kerusakan hepar akibat pemberian karbon tetraklorida dosis toksik berdasarkan skor kerusakan histopatologi HAI (*Histology Activity Indeks*)-Knodell Score. Berdasarkan hal tersebut, dapat disimpulkan

bahwa pemberian ekstrak daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) dapat menurunkan HAI (*Histology Activity Indeks*)-*Knodell Score* pada hepar mencit yang diinduksi dengan karbon tetraklorida dosis toksik.

SARAN

Diperlukan penelitian yang lebih lanjut untuk meneliti dosis efektif ekstrak daun Sambiloto dalam mencegah kerusakan hepar dan efek toksiknya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kementerian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi. Situasi dan Analisis Hepatitis. Jakarta Selatan. 2014.
2. The National Institute for Occupational Safety and Health. Carbon Tetrachloride. Available from: <https://www.cdc.gov/nioshrtecs/FG4AC4A0.html>. 2017.
3. Kumar, A., Sridevi, K., Kumar, N., Nanduri, S., Rajagopal, S. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *Journal Ethnopharmacology*, 2004;92(2-3):291-296.
4. Lala, S., Nandy, A., Mahato, S., Basu, M. Delivery in-vivo of 14-deoxy-11-oxoandrographolide, anti-leishmanial agent, by different carriers. *Indian Journal Biochemistry Biophysic*, 2004;40:169-74.
5. Liu, J., Wang, Z., Ji, L. In vivo and in vitro anti-inflammatory activities of neandrographolide. *Journal China Medical*, 2007;35(2):317-28.
6. Ibe, K., Kapil, A. Effect of diterpenes from *Andrographis paniculata* on antioxidant defense system and lipid peroxidation. *Indian Journal Pharmacology*, 1994;26:296-300.
7. Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H., Sun, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemical*, 2007;102(3):38-53.
8. Chen, C.Y., Chen, C.F., Chiou, W.F. Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *British Journal of Pharmacology*, 2002; 135(2):399-406.
9. Tsai, H.R., Yang, L.M., Tsai, W.J., Chiou, W.F. Andrographolide acts through inhibition of ERK1/2 and Akt phosphorylation to suppress chemotactic migration. *European Journal of Pharmacology*, 2004;498(1-3):45-52.
10. Xia, Y.F., Ye, B.Q., Li, Y.D., Wang, J.G., He, X.J., Lin, X. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF- κ B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50. *Journal of Immunology*, 2004;173:4207-4217
11. Qin, L.H., Kong, L., Shi, G.J., Wang, Z.T., Ge, B.X. Andrographolide inhibits the production of TNF- α and IL-12 in LPS stimulated macrophages: role of mitogen activated protein kinases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006;29:220-224.
12. Chou W.F., Chen C.F., Lin J.J. Mechanism of suppression of inducible iNOS expression in RAW 264 7 cells. *Andrographolide British Journal of Pharmacology*. 2000;129(8):1553-1560.
13. Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*, 2003;189:113-127.
14. Brouckaert P., Fiers W., Curr. Top. Tumor Necrosis Factor and the Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Microbiol. Immunol.*, 1996;216:167-187.
15. Feng, J., Zhu, H., Feng, Z. Protective Mechanism of Andrographolide against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Biol Pharm*, 2011;34(2):1666-1670.
16. McNally S. J., Harrison E. M., Ross J. A., Garden O. J., Wigmore S. J. Curcumin induces heme oxygenase-1 in hepatocytes and is protective in simulated cold preservation and warm reperfusion injury. *Transplantation*, 2006;81:623-626.
17. Otterbein L. E., Soares M. P., Yamashita K., Bach F. H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme *Trends Immunol.*, 2003;24:449-455.
18. Feng, J., Zhu, H., Feng, Z. Protective Mechanism of Andrographolide against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Biol Pharm*, 2011;34(2):1666-1670.
19. Brunetti, C., Ferdinando, M., Fini, A., Pollastri, S. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *Int J Mol Sci*, 2013;14(2):3540-3555.

20. Rao, K., Vimalamma, G., Rao, CV. Flavonoids and andrographolides from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry*, 2004;65(16):2317-2321.
21. Sheeja, P., Shihab, Kuttan, G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Plant *Andrographis Paniculata* Nees. *Immunopharmacology and Immunotoxicology: Northeastern*. 2006;28(1):129-140.