

# Induksi Ekstrak Pegagan Secara *in vitro* terhadap Proliferasi dan Diferensiasi Sel-Sel Otak Besar Anak Tikus

(*IN VITRO* INDUCTION OF *CENTELLA ASIATICA* (PEGAGAN) EXTRACT ON THE PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF NEWBORN RAT CORTEX CEREBRI CELLS)

Ita Djuwita<sup>1</sup>, Min Rahminiwati<sup>1a,2</sup>, Latifah Kosim Darusman<sup>2</sup>, Siti Sa'diah<sup>1a,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Embriologi, <sup>1a</sup>Laboratorium Farmakologi Departemen Anatomi Fisiologi Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680, Telp/Fax :0251-8421823/0251-8629464,

<sup>2</sup>Pusat Studi Biofarmaka, Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, IPB  
E-mail: djuwitawiryadi@yahoo.com

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menganalisis kemampuan ekstrak pegagan dalam menginduksi proses proliferasi dan neurogenesis dari sel-sel korteks serebrum tikus neonatal dalam medium kultur *in vitro*. Penelitian *in vitro* ini menggunakan sel-sel otak besar anak tikus (*Sprague Dawley*) umur tiga hari dalam medium dasar *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang mengandung *Newborne Calf Serum* (NBCS) 10% dan gentamisin 50 µg/mL (mDMEM) dengan dan tanpa penambahan ekstrak daun pegagan/*Centella asiatica* (CA). Terdapat lima kelompok perlakuan yang terdiri dari kontrol positif (mDMEM+*asiaticoside* (AC) 30µg/mL), kontrol negatif (mDMEM), mDMEM dengan penambahan tiga konsentrasi CA yakni 100 ppm, 200 ppm, dan 400 ppm. Kultur dilakukan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, pada suhu 37°C selama enam hari. Parameter yang diamati adalah *Population Doubling Time* (PDT), komposisi neuron, dan sel glia, serta panjang akson dan dendrit masing-masing berdasarkan penghitungan menggunakan hemositometer, pewarnaan HE, dan pengukuran akson-dendrit neuron menggunakan mikrometer. Data dianalisis dengan sidik ragam. Hasil induksi ekstrak pegagan pada konsentrasi 100 ppm terhadap sel-sel korteks serebrum menunjukkan terjadinya neurogenesis, meningkatkan pertumbuhan panjang akson tanpa memengaruhi kecepatan proliferasi. Namun, pada konsentrasi 200 dan 400 ppm, ekstrak CA menghambat proliferasi dan pertumbuhan akson neuron (P<0,05). Sebagai kesimpulan penambahan ekstrak *C. asiatica* pada konsentrasi 100 ppm dapat meningkatkan pertumbuhan panjang akson neuron dan kecenderungan menginduksi neurogenesis, sedangkan pada dosis tinggi ekstrak CA bersifat neurotoksik.

Kata kunci: Kultur, neuron, ekstrak *Centella asiatica*, neurogenesis

## ABSTRACT

The aim of the study was to analyze the potency of *Centella asiatica* extract to induce proliferation and neurogenesis process of newborn rats cortex cerebri. Research has been conducted on *in vitro* culture of three days old rat (*Sprague Dawley*) cerebrium cells in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) containing 10% NEAA (Non Essential Amino Acid), 1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10% NBCS (*Newborn Calf Serum*) and 50 µg/mL gentamycin (mDMEM), with and without *Centella asiatica* (CA) leaf extracts. The experiment was set in five groups of treatment consisted of positive control (mDMEM+30 µg/mL *asiaticoside* (AC)), negative control (mDMEM), and mDMEM with three concentration of CA extract i.e. 100 ppm, 200 ppm and 400 ppm. Culture was done in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for six days. The parameters observed were cells proliferation based on *Population Doubling Time* (PDT), neuron and glia composition, and the length of axon and dendrite. Cells concentration were counted using *Newbauer hemocytometer*. Neuron and glia cells were determined based on morphology after *Hematoxylin-Eosin* staining, and the length of axon and dendrite were measured using *eyepiece micrometer*. Data were analyzed using ANOVA and Duncan test. The results showed that *Centella asiatica* extract at concentration 100 ppm could induce neurogenesis and increased the axon length growth. However, at concentration 200 and 400 ppm, CA extract inhibited the neuronal cells proliferation and the axonal growth (P<0,05). In conclusion, induction of *Centella asiatica* extracts at concentration of 100 ppm on the cortex cell cerebrium cells culture increase the axon length growth and tends to induce neurogenesis; however at higher concentration CA extract was neurotoxic.

Keywords: cell culture, neuron, *Centella asiatica* leaf extracts, neurogenesis

## PENDAHULUAN

Otak besar (serebrum) merupakan pusat saraf utama yang berfungsi untuk pengaturan semua aktivitas tubuh, berkaitan dengan kepandaian (inteligensi), ingatan (memori), kesadaran, dan pertimbangan. Jaringan saraf terdiri dari sel saraf (neuron) dan sel glia yang masing-masing memiliki fungsi untuk menyampaikan sinyal dari satu sel ke sel lainnya dan untuk melindungi, mendukung, merawat, serta mempertahankan homeostasis cairan di sekeliling neuron (Djuwita *et al.*, 2012). Jaringan otak pada sistem saraf pusat (SSP) sangat peka terhadap berbagai cedera di antaranya akibat stres oksidatif dan trauma mekanik (Lee *et al.*, 2002). Cedera SSP dan penyakit neurodegeneratif dapat mengakibatkan berbagai tingkat kematian neuron dan kelemahan memori, serta degenerasi akson dan dendrit yang dapat menghambat penyaluran impuls (Jackson *et al.*, 2010).

Dalam beberapa dekade terakhir, beberapa peneliti telah membuktikan bahwa dalam beberapa bagian jaringan otak dewasa dari berbagai spesies termasuk manusia masih terdapat populasi *neural stem cells* (NSCs) ataupun *neural progenitor cells* (NPCs) (Gage, 2000; Cao *et al.*, 2002; Djuwita *et al.*, 2012). Secara *in vivo* dan *in vitro* telah dibuktikan bahwa NSCs dan NPCs memiliki kapasitas untuk menjalani proses neurogenesis bahkan memperbaiki kondisi jaringan yang rusak (Richard *et al.*, 1992; Lois dan Buylla, 1993; Reynolds dan Weiss, 1993; Taupin dan Gage, 2002; Goldman 2004). Goldman (2004) melaporkan bahwa proses neurogenesis dan gliogenesis tetap berlangsung pada beberapa daerah otak dewasa, namun kemampuan regenerasi tersebut sangat terbatas.

Beberapa faktor endogenous antara lain *nerve growth factor* (NGF) (Bocchini dan Angeletti, 1969), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) (Kirschenbaum dan Goldman, 1993; Pencea *et al.*, 2001), dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Jin *et al.*, 2002) terbukti dapat menginduksi proses neurogenesis secara *in vivo* pada otak tikus dewasa (Cameron *et al.* 1998). Selain faktor endogenous, telah dilaporkan pula beberapa produk tanaman memiliki kemampuan sebagai *neuroprotective* terhadap stres oksidatif yang dapat mengakibatkan kematian neuron di antaranya adalah ekstrak ginseng (Kim *et al.*, 2008), ekstrak *Ginkgo biloba* (Watanabe *et al.*,

2001) dan ekstrak *Centella asiatica* (CA) atau pegagan (Kumar dan Gupta, 2002; 2003; Rao *et al.*, 2005; Heleagrahara dan Ponnusamy, 2010; Jana *et al.*, 2010).

*Centella asiatica* L. (CA), termasuk dalam family *Umbelliferae*, yang secara tradisional telah diyakini dapat memperkuat memori dan melindungi neuron dari stres oksidatif (Zheng dan Qin., 2007; Jana *et al.*, 2010). Kajian terhadap fitokimia CA menunjukkan adanya kandungan terpenoid dan flavonoid, sedangkan senyawa bioaktif yang paling menonjol aktivitasnya adalah *asiaticoside* yang terbukti dapat melindungi neuron dari stres oksidatif dan mencegah terjadinya apoptosis sel (Lee *et al.*, 2000; Subban *et al.*, 2008; James dan Dubery, 2009).

Namun demikian, apakah ekstrak CA dapat menginduksi proliferasi dan diferensiasi sel-sel progenitor saraf (neurogenesis) belum banyak dilaporkan. Penelitian ini ditujukan untuk menganalisis kemampuan ekstrak CA dalam menginduksi proses proliferasi dan neurogenesis dari sel-sel korteks serebrum tikus neonatal dalam medium kultur *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Isolasi dan Kultur Sel Saraf Otak Besar

Isolasi dan kultur sel saraf otak dilakukan berdasarkan Djuwita *et al.*, (2012). Tikus *strain Sprague Dawley* umur tiga hari dikorbankan nyawanya terlebih dahulu dengan menggunakan eter, kemudian daerah kepala didesinfeksi dengan alkohol 70%. Otak bagian serebrum diisolasi dan dicuci dengan larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 0,5% dan gentamycin 50 mg/mL. Suspensi otak dibuat dengan cara menyedot dan mengeluarkan kembali secara berulang menggunakan spuit 1 cc yang mengandung larutan PBS + FBS + Sentamycine (mPBS). Suspensi dimasukkan ke dalam tabung dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 210 g selama 10 menit. Pencucian dilakukan dengan mPBS sebanyak empat kali ulangan dan medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) yang diberi tambahan asam amino non esensial (AANE) 10%, FBS 10% dan gentamycin 50 mg/ml (disingkat mDMEM) sebanyak satu kali ulangan. Terakhir pelet diresuspensi dalam larutan mDMEM sebanyak 1 mL.

Sebelum dikultur, jumlah sel dihitung menggunakan hemositometer *Improved Neubauer*. Sel dengan konsentrasi  $6 \times 10^4$  sel/mL dikultur dalam cawan petri yang telah dilapisi dengan gelatin 0,1% dan berisi 2 mL mDMEM dengan dan tanpa ekstrak CA (Kultur sel otak untuk evaluasi menggunakan pewarnaan, ditumbuhkan di atas *cover glass* yang telah dilapisi dengan gelatin 0,1%). Kultur dilakukan di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C. Medium mDMEM dan perlakuan diganti setiap dua hari sekali sebanyak 2 mL setiap penggantian. Kultur dilakukan sampai hari keenam.

#### Evaluasi Hasil Kultur Sel-Sel Serebrum Tingkat Proliferasi Berdasarkan *Population Doubling Time*.

Tingkat proliferasi ditentukan berdasarkan penghitungan jumlah sel sebelum dan setelah kultur. Peningkatan (proliferasi) sel diketahui dari total sel yang tumbuh menggunakan kamar hitung hemositometer *Improved Neubauer* dengan perhitungan sebagai berikut: Total sel (sel/mL) = jumlah sel pada lima kotak x faktor pengenceran x  $10^4$ .

*Population Doubling Time* adalah waktu yang diperlukan oleh populasi sel untuk menjadikan jumlahnya dua kali dari jumlah semula. *Population Doubling Time* (hari) dihitung menggunakan rumus:  $1 \text{ per } ((\log \text{ jumlah sel akhir dikurangi } \log \text{ jumlah sel awal}) \times 3,32) \text{ per waktu kultur}$  (Davis, 2011).

#### Diferensiasi Sel-Sel Serebrum

**Komposisi Jumlah Neuron dan Glia.** Identifikasi tipe-tipe sel (neuron dan glia) yang tumbuh dilakukan berdasarkan pengamatan morfologi baik secara natif maupun setelah sel diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Kultur sel yang ditumbuhkan di atas *cover glass* dicuci menggunakan PBS kemudian difiksasi dalam larutan bufer paraformaldehid 4% selama 24 jam. Sebelum pewarnaan HE preparat kultur sel direndam dalam alkohol 50% selama tiga menit, kemudian direndam berturut-turut dalam aquades selama lima menit dan hematoksin empat menit, dan dibilas kembali dengan aquades. Selanjutnya direndam dalam eosin selama dua menit dan dibilas dengan aquades. Setelah pewarnaan, preparat kultur sel didehidrasi dalam alkohol bertingkat yakni 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut tiga kali ulangan, masing-masing 10 menit dan dilanjutkan dalam xilol

dua kali ulangan, kemudian *dimounting* pada gelas objek menggunakan entelan. Evaluasi dilakukan dengan mengamati morfologi sel dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 40x10.

**Pertumbuhan Panjang Akson dan Dendrit Neuron.** Pertumbuhan panjang akson dan dendrit neuron diamati dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 40x10 dan diukur menggunakan *eyepiece* mikrometer. Jumlah sel yang diukur sebanyak 50 neuron untuk masing-masing ulangan.

#### Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Ekstrak CA yang diperoleh dari Pusat Studi Biofarmaka Institut Pertanian Bogor, diekstraksi dalam larutan etanol. Terdapat lima kelompok perlakuan yang terdiri dari mDMEM (kontrol negatif), mDMEM+CA 100 ppm, mDMEM+CA 200 ppm, mDMEM+CA 400 ppm serta mDMEM + AC 30 µg/mL (kontrol positif). *Asiaticoside* (AC) komersial digunakan sebagai kontrol positif. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Parameter yang diamati yaitu *Population Doubling Time* (PDT), komposisi jumlah neuron dan sel glia, serta panjang akson dan dendrit. Data-data yang diperoleh dianalisis secara sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan dengan tingkat kepercayaan 95%.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Tingkat Proliferasi Berdasarkan *Population Doubling Time*

Selama enam hari kultur sel-sel korteks serebrum pada perlakuan kontrol negatif dan ekstrak CA 100 ppm menunjukkan tingkat proliferasi yang konstan dengan nilai PDT yaitu masing-masing  $3,78 \pm 0,31$  dan  $3,82 \pm 0,28$  ( $P > 0,05$ ) (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak CA 100 ppm kedalam medium kultur sel-sel korteks serebrum tidak mempercepat proses proliferasi. Pada kontrol positif terjadi kecenderungan percepatan proliferasi namun tidak nyata. Sebaliknya pada pemberian ekstrak CA 200 dan 400 ppm nilai PDT masing-masing adalah  $5,17 \pm 0,41$  dan  $6,79 \pm 2,53$  lebih tinggi dibandingkan nilai PDT kontrol negatif ( $P < 0,05$ ).

Tingkat proliferasi pada kontrol negatif dan pemberian ekstrak CA 100 ppm menunjukkan tingkat proliferasi yang normal yakni waktu

Tabel 1 Tingkat proliferasi sel korteks serebrum dalam medium yang diberi ekstrak *C.asiatica* (CA)

PDT ( <i>Population Doubling Time</i> ) (Hari)				
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	CA 100ppm	CA 200ppm	CA 400ppm
3,28 ± 0,26 <sup>a</sup>	3,78 ± 0,31 <sup>a</sup>	3,82 ± 0,28 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,41 <sup>b</sup>	6,79 ± 2,53 <sup>b</sup>

Huruf *superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ).

Tabel 2 Persentase neuron dan sel glia pada masing-masing perlakuan (%) *C.asiatica* (CA)

Jenis Sel	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	CA 100ppm	CA 200ppm	CA 400ppm
Neuron	69,03 ± 3,47 <sup>a</sup>	47,19 ± 1,94 <sup>c</sup>	52,55 ± 2,90 <sup>b</sup>	42,29 ± 1,46 <sup>d</sup>	31,95 ± 1,70 <sup>e</sup>
Glia	30,97 ± 3,47 <sup>a</sup>	52,81 ± 1,94 <sup>b</sup>	47,45 ± 2,90 <sup>b</sup>	57,71 ± 1,46 <sup>c</sup>	68,90 ± 1,20 <sup>d</sup>

Huruf *superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ).

PDT sekitar 3-4 hari. *Asiaticoside* merupakan senyawa bioaktif yang berasal dari tanaman *asiatica*, yang telah terbukti dapat melindungi neuron dari stres oksidatif dan mencegah terjadinya apoptosis. Pada kontrol positif (*asiaticoside* komersial) dengan konsentrasi 30 ppm menunjukkan kecenderungan peningkatan kecepatan proliferasi ( $P > 0,05$ ). Namun, dosis optimum pemberian *asiaticoside* untuk meningkatkan proliferasi kultur sel-sel otak adalah  $d''$  100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Musalmah *et al.*, 2006); karenanya pada penelitian ini walaupun ada kecenderungan peningkatan kecepatan proliferasi namun tidak nyata.

Pemberian ekstrak CA pada konsentrasi tinggi 200–400 ppm menghambat proses proliferasi bahkan mengakibatkan kesusakan dan kematian neuron. Zat-zat yang bersifat neurotoksik dapat menyebabkan kematian neuron, degenerasi akson dan dendrit, serta peningkatan jumlah neuroglia (Woehrling *et al.*, 2010).

#### Komposisi Jumlah Neuron dan Sel Glia

Komposisi neuron dan sel glia pada kontrol negatif adalah 47,19% dan 52,81%. Dibandingkan dengan kontrol negatif, pada kontrol positif persentase jumlah neuron meningkat secara nyata menjadi  $69,03 \pm 3,47$ , sedangkan pada pemberian ekstrak CA 100 ppm menunjukkan kecenderungan terjadinya peningkatan persentase jumlah neuron yakni  $52,55 \pm 2,90$  ( $P > 0,05$ ). Sebaliknya, pemberian ekstrak CA 200 dan 400 ppm menunjukkan

penurunan persentase jumlah neuron dan peningkatan persentase sel glia (Tabel 2).

Sel glia yang ditemukan pada kultur sel-sel korteks serebrum adalah astrosit, oligodendrosit, dan mikroglia. Komposisi neuron dan sel glia pada kontrol negatif sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya (Djuwita *et al.*, 2012). Sel glia memiliki jumlah yang lebih banyak karena digunakan untuk membantu pertumbuhan neuron melalui absorpsi nutrisi secara optimal. Sel glia merupakan sel-sel yang menjaga, memelihara, dan mendukung neuron.

Pemberian ekstrak CA dengan konsentrasi rendah yang menunjukkan kecenderungan terjadinya peningkatan persentase neuron, mengindikasikan bahwa ekstrak CA mampu menginduksi proses diferensiasi sel-sel progenitor saraf (NPCs) menjadi neuron atau dikenal dengan proses neurogenesis. Hal yang sama dilaporkan oleh Rao *et al* (2009) yang membuktikan bahwa ekstrak CA mampu menstimulasi neurogenesis. Hasil penelitian Khotimah *et al.*, 2009 membuktikan bahwa pemberian ekstrak CA 100 ppm mampu meningkatkan kadar BDNF yang diketahui memiliki peranan dalam neurogenesis (Pencea *et al.*, 2001).

Pada pemberian ekstrak CA 200 dan terutama pada konsentrasi 400 ppm terjadi penurunan persentasi jumlah neuron akibat terjadinya kerusakan dan atau kematian neuron; sementara terjadi peningkatan jumlah sel glia. Diperkirakan bahwa pada konsentrasi tersebut ekstrak CA bersifat toksik pada neuron.



Tabel 3 Panjang akson dan dendrit neuron pada masing-masing perlakuan ( $\mu\text{m}$ ) *C.asiatica* (CA)

	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	CA 100ppm	CA 200ppm	CA 400ppm
Akson	21,50 $\pm$ 3,37 <sup>b</sup>	18,11 $\pm$ 2,25 <sup>ab</sup>	31,45 $\pm$ 2,09 <sup>c</sup>	29,53 $\pm$ 5,08 <sup>bc</sup>	13,69 $\pm$ 4,92 <sup>a</sup>
Dendrit	9,27 $\pm$ 3,60 <sup>a</sup>	10,28 $\pm$ 2,19 <sup>a</sup>	9,6 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	1,27 $\pm$ 2,39 <sup>b</sup>	8,01 $\pm$ 2,98 <sup>a</sup>

Huruf *superscript* yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ).

Pada sistem *in vivo*, terjadinya toksisitas pada sistem saraf dapat menyebabkan infiltrasi sel glia (Shearer dan Fawcett 2001). Hal ini sejalan dengan peneliti sebelumnya yang melaporkan bahwa ekstrak etanol CA pada konsentrasi  $>100\mu\text{g/mL}$  bersifat neurotoksik (Norfaizatul *et al.*, 2011).

### Pertumbuhan Panjang Akson dan Dendrit

Panjang akson dalam medium yang ditambahkan ekstrak CA 100 dan 200 ppm adalah masing-masing  $31,45 \pm 2,09$  dan  $29,53 \pm 5,08$ , secara nyata lebih panjang dibandingkan dengan pada kontrol  $18,11 \pm 2,25$  (Tabel 3). Namun sebaliknya pada konsentrasi 400 ppm, ekstrak CA menghambat pertumbuhan akson, bahkan mengakibatkan kerusakan bahkan kematian neuron. Ukuran panjang akson dan dendrit pada penelitian ini lebih pendek dibandingkan pada penelitian sebelumnya (Djuwita *et al.*, 2012), hal ini disebabkan adanya perbedaan lamanya waktu kultur.

Kemampuan ekstrak CA untuk meregenerasi akson serta neurogenesis merupakan hal yang penting untuk meningkatkan pertumbuhan morfologi dan meningkatkan fungsi neuron serta untuk proses penyembuhan neuron yang mengalami kerusakan. Baik ekstrak CA maupun daun CA segar dapat memperbaiki morfologi neuron serta meningkatkan fungsi otak pada mencit muda (Rao *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2009). Bahkan pemberian ekstrak CA ke dalam air minum tikus menunjukkan penyembuhan lebih cepat dalam regenerasi akson setelah kerusakan neuron dibandingkan dengan kontrol (Soumyanath *et al.*, 2005). Lebih lanjut Omar *et al.*, (2009) menyarankan pemberian ekstrak CA untuk pengobatan pasien yang mengalami kerusakan kognitif ringan ataupun untuk menghindari penurunan kemampuan kognitif pada masa *aging*.

Pada konsentrasi tinggi ekstrak CA bersifat neurotoksik (Norfaizatul *et al.*, 2011). Akson dan dendrit merupakan penjuruan neuron yang berfungsi untuk menghantarkan impuls.

Kerusakan pada neuron dapat mengakibatkan terjadinya degenerasi akson (Shearer dan Fawcett 2001) sehingga mengakibatkan terjadinya infiltrasi astrosit.

### SIMPULAN

Penambahan ekstrak *Centella asiatica* pada konsentrasi 100 ppm dapat meningkatkan pertumbuhan panjang akson neuron dan cenderung menginduksi neurogenesis, sedangkan pada dosis tinggi ekstrak CA bersifat neurotoksik.

### SARAN

Penggunaan ekstrak *Centella asiatica* untuk menginduksi neurogenesis pada kultur sel otak besar anak tikus sebaiknya menggunakan konsentrasi  $< 100$  ppm/mL.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami sampaikan kepada Pusat Studi Biofarmaka Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Institut Pertanian Bogor, yang telah menyediakan dan memberikan ekstrak *Centella asiatica* (pegagan) untuk uji *in vitro* pada sel-sel korteks serebrum anak tikus.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bocchini V, Angeletti, PU. 1969. The nerve growth factor: purification as a 30,000 molecular weight protein. *Proc Natl Acad Sci* 64:787-794.
- Cao Q, Benton RL, Whittenmore SR. 2002. Stem cell repair of central nervous system injury. *J Neurosci Res* 68:501-510.
- Cameron HA, Hazel TG, Mckay RD. 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol* 2 :287-306.

- Davis JM. 2011. Basic techniques and media, the maintenance of cell lines and safety. John M.D (Ed). In *Animal Cell Culture Essential Methods*. UK. John Wiley and Sons Ltd.
- Djuwita I, Riyacumala V, Mohamad K, Prasetyaningtyas WE, Nurhidayat. 2012. Pertumbuhan dan sekresi protein hasil kultur primer sel serebrum anak tikus. *J Veteriner* 13(2):125-135.
- Gage FH. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Goldman SA. 2004. Directed mobilization of endogenous neural progenitor cells the intersection of stem cell biology and gene therapy. *Curr Opin Mol Ther* 6 :466-472.
- Heleagrahara N, Ponnusamy K. 2010. Neuroprotective effect of *Centella asiatica* extract (CAE) on experimentally induced Parkinsonism in aged Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Sci* 35(1): 41-47.
- Jackson JS, Golding JP, Chapon C, Jones WA, Bhakpp KK. 2010. Homing of stem cells to sites of inflammatory brain injury after intracerebral and intravenous administration: a longitudinal imaging study. *Stem Cells Research and Therapy* 1:17.
- James JT, Dubery IA. 2009. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) *Molecules* 14(10): 3922-3941.
- Jana U, Sur TK, Maity LN, Debnath PK, Bhattacharyya D. 2010. A clinical study on the management of generalized anxiety disorder with *Centella asiatica*. *Nepal Med Coll J* 12(1): 8-11.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *PNAS* 99 (18) :11946-11950.
- Khotimah H, Riawan W, Kalsum U. 2009. Efek neuroprotektif ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) terhadap BDNF (brain-derived neurotropic factor), TNFaR, NFkB dan apoptosis pada kultur sel syaraf yang diinduksi LPS. Laporan Hibah Penelitian Strategis Nasional. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional.
- Kim S, Nah SY, Rhim H. 2008. Neuroprotective effects of ginseng saponins against L-type Ca<sup>2+</sup> channel-mediated cell death in rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Comm* 365: 399-405.
- Kirschenbaum B, Goldman SA. 1995. Brain derived neurotrophic factor promotes the survival of neuron arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:210-214.
- Kumar MH, Gupta YH. 2002. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in rats. *J Ethnopharmacol.* 79:253-260.
- Kumar MH, Gupta YH. 2003. Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intra cerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30:336-342.
- Lee MK, Kim SR, Sung SH, Lim D, Kim H, Choi H, Park HK, Je S, Ki YC. 2000. Asiatic acid derivatives protect cultured cortical neurons from glutamate-induced excitotoxicity. *Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology* 108(1-2): 75-86.
- Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. 2002. Stress and depression in the central nervous system. *Glia* 30(2) :105-121.
- Lois C, Buylly A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2074-2077.
- Musalmah M, Then SM, Mat TG, Wan NWZ. 2006. Comparative effects of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol against hydrogen peroxide induced apoptosis on primary-cultured astrocytes. *J Neurol Sci* 243: 5-12.
- Norfaizatul SO, Zetty ACZ, Then SM, Wan ZWN, Musalmah M. 2011. *Centella asiatica* modulates neuron cell survival by altering caspase-9 pathway. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(11): 2201-2109.
- Omar DRD, Mohamed S, Hambali Z, Abu SB. 2009. Comparison of cognitive effects of *Entella asiatica* in healthy middle female and male volunteers. *Eur J Sci Res* 31: 553-565.
- Pencea V, Bingaman KD, Wirgand SJ, Luskin MB. 2001. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21 :6706-6717.

- Rao SB, Chetana M, Uma Devi P. 2005. *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. *J Physiol Behav* 86:449-457.
- Rao KGM, Rao SM, Rao SG. 2009. Enhancement of amygdaloid neuronal dendritic arborization by fresh leaf juice of *Centella asiatica* (Linn) during growth spurt period in rats. *eCAM* 6(2): 203–210
- Renolds BA, Weiss S. 1993. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Richard LJ, Kilpatrick TJ, Bartlerr PF. 1992. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8591-8595.
- Soumyanath A, Zhong YP, Gold SA, Yu X, Koop DR, Bourdette D, Gold BG. 2005. *Centella asiatica* accelerates nerve regeneration upon oral administration and contains multiple active fractions increasing neurite elongation *in vitro*. *J Pharm Pharmacol* 57:1221-1229.
- Shearer MC, Fawcett JW. 2001. The astrocyte/meningeal cell interface – a barrier to successful nerve regeneration?. *Cell Tissue Res*. 305:267–273.
- Subban R, Veerakumar A, Manimaran R, Hashim KM, Balachandran I. 2008. Two new flavonoids from *Centella asiatica* (Linn.). *J Nat Med* 62(3): 369-373.
- Taupin P, Gage FH. 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69 (6) :745-749.
- Watanabe CMH, Wolfram S, Ader P, Rimbach G, Packer L, Maguire JJ, Schultz PG, Gohil K . 2001. The *in vivo* neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*. *PNAS* 98: 6577-6580.
- Woehrling EK, Hill EJ, Coleman ED. 2010. Evaluation of the importance of astrocytes when screening for acute toxicity in neuronal cell systems. *Neurotox Res* 17:103-113.
- Zheng CJ, Qin LP. 2007. Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 5:348–351.