

Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Gambaran Histopatologi Limpa Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Sodium Nitrit Sub Akut

Ainun Nur Afiqoh¹, Ika Fidianingsih¹, Ety Sari Handayani¹

¹Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

Abstrak

Sodium nitrit adalah senyawa garam yang secara luas digunakan sebagai pengawet dan pewarna merah daging. Konsumsi berlebihan dan dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan terbentuknya senyawa karsinogenik dan terbentuk methemoglobin. Methemoglobin dapat menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat menyebabkan stres oksidatif pada berbagai sel tubuh salah satunya sel limfosit pada pulpa putih limpa. Sel limfosit yang berperan penting dalam sistem imun tubuh ini dapat mengalami nekrosis karena oksidan ini. Pemberian ekstrak etanol daun pegagan diharapkan dapat mencegah efek dari sodium nitrit. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun pegagan terhadap gambaran histopatologi limpa tikus yang diinduksi dengan sodium nitrit subakut. Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan *posttest control group design*. Sampel dibagi ke dalam 3 kelompok dengan 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok. Kelompok tersebut adalah kelompok kontrol, PI (sodium nitrit 50 mg/kgBB), dan PII (sodium nitrit 50 mg/kgBB dan ekstrak etanol daun pegagan 600 mg/kgBB). Setelah perlakuan selama 42 hari, diambil preparat limpa tikus untuk dilihat rata-rata luas pulpa putih. Terdapat perbedaan tidak bermakna rata-rata luas pulpa putih pada setiap kelompok dengan rata-rata terkecil terdapat pada kelompok PI ($p=0,899$). Ekstrak etanol daun pegagan tidak berpengaruh secara bermakna terhadap gambaran histopatologi limpa yang diinduksi sodium nitrit subakut.

Kata kunci: limpa, pegagan, pulpa putih, sodium nitrit

The Effect Of Pegagan Leaf (*Centella asiatica*) Ethanol Extract on Spleen Histopathology In Rat (*Rattus norvegicus*) Induced by Sub Acute Sodium Nitrite

Abstract

Sodium nitrite is an inorganic salt that is widely used as preservative and color fixative in meat. Overconsumption in the long time of sodium nitrite can form carcinogenic compound and methemoglobin in the body. Methemoglobin induces production of *Reactive Oxygen Species* (ROS) that initiates oxidative stress in body cells such as lymphocyte cells of white pulp spleen. Lymphocyte cells that have important role in immunity system will do necrosis because of the oxidant. The ethanol extract of pegagan leaf is expected to inhibit adverse effect of sodium nitrite. This study was designed to investigate the effect of ethanol extract of pegagan leaf (*Centella asiatica*) on spleen histopathology in rat (*Rattus norvegicus*) induced by sub acute sodium nitrite. This is an experimental study with *posttest control group design*. Subject was divided into 3 groups with 5 rats in each group. First one is control group. The second is PI (administered sodium nitrite 50 mg/kgBB) and third is PII (administered sodium nitrite 50 mg/kgBB and ethanol extract of pegagan leaf 600 mg/kgBB). After 42 days of study, tissue specimen of spleen was collected to examine the mean of white pulp areas. There is insignificant difference in the mean of white pulp areas between each group ($p=0,899$). The lowest mean of white pulp areas is showed by second group (PI). The effect of ethanol extract of pegagan leaf on spleen histopathology in rat induced by sub acute sodium nitrite is insignificant.

Keywords: pegagan, spleen, sodium nitrite, white pulp

Korespondensi: Ika Fidianingsih, Jalan Kaliurang Km. 14.4 55584 Sleman DI Yogyakarta, ikafidy@yahoo.com

Pendahuluan

Sodium nitrit merupakan garam yang terbentuk dari ikatan antara natrium dan ion nitrit. Sodium nitrit sudah digunakan sebagai pengawet daging sejak beberapa dekade lalu, khususnya karena sodium nitrit terbukti

mencegah pertumbuhan bakteri *Clostridium botulinum* yang merupakan bakteri penyebab keracunan makanan.¹ Tidak hanya sebagai pengawet daging, sodium nitrit juga dapat memberikan warna merah pada daging karena nitrit yang terurai menjadi nitrit

oksida akan bereaksi dengan mioglobin pada daging sehingga terbentuk nitrosomioglobin. Karena efeknya tersebut, sodium nitrit digunakan secara luas khususnya pada produk ham, sosis, *hot dog*, dan ikan asap. Produk-produk tersebut merupakan produk yang sangat sering dikonsumsi oleh masyarakat luas. Meskipun terdapat dosis aman untuk sodium nitrit, namun beberapa produk masih mengandung nitrit dalam jumlah melebihi batas anjuran Permenkes RI No. 1168/Menkes/Per/X/1999.^{2,3}

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa konsumsi berlebihan sodium nitrit berefek buruk terhadap kesehatan, salah satunya dapat memicu kanker karena di dalam tubuh nitrit dapat diubah menjadi nitrosamin yang bersifat karsinogenik.⁴ Nitrit juga dapat diperoleh dari nitrat yang masuk ke dalam tubuh. Sekitar 6% nitrat yang masuk ke dalam tubuh akan direduksi menjadi nitrit yang lebih berbahaya bagi tubuh. Nitrit (NO_2^-) dan nitrat (NO_3^-) adalah ion-ion anorganik alami, yang merupakan bagian dari siklus nitrogen. Aktifitas mikroba di tanah atau air menguraikan sampah yang mengandung nitrogen organik menjadi ammonia, kemudian dioksidasikan menjadi nitrit dan nitrat. Oleh karena nitrit dapat dengan mudah dioksidasikan menjadi nitrat, maka nitrat adalah senyawa yang paling sering ditemukan di dalam air bawah tanah maupun air yang terdapat di permukaan. Data dari Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pemberantasan Penyakit Menular (BBTKL-PPM) menunjukkan bahwa ada beberapa kecamatan di Yogya yang meningkat kepadatan penduduknya memiliki kandungan nitrat dalam air sumur di atas ambang batas. Tiga Kecamatan yang contoh ujinya mengandung nitrat tinggi adalah Gondokusumo, Kotagede, dan Danurujen.⁵ Konsentrasi berlebihan nitrat dalam air minum dilaporkan menyebabkan methemoglobinemia pada anak.⁶

Methemoglobinemia terjadi setelah reduksi nitrat menjadi nitrit di dalam tubuh. Perubahan hemoglobin menjadi methemoglobin menyebabkan terjadinya

hipoksia jaringan. Hipoksia jaringan menyebabkan kegagalan metabolik, stres oksidatif, gangguan homeostasis dan mencetuskan apoptosis. Terbentuknya methemoglobin juga menyebabkan integritas eritrosit terganggu sehingga eritrosit akan mudah mengalami lisis. Dari beberapa penelitian, ditemukan efek jangka pendek dari penggunaan sodium nitrit adalah perubahan berat limpa.^{7,8,9}

Limpa merupakan organ tubuh yang memiliki peranan penting dalam hemopoiesis dan sistem imun. Secara histologis, limpa memiliki pulpa merah yang berperan dalam menjaga integrasi sel darah merah dan memiliki pulpa putih yang berperan sebagai organ limfatik dalam limpa. Dalam proses hemapoiesis, limpa merupakan organ utama hemapoiesis pada janin usia 2-7 bulan. Setelah usia 7 bulan janin, fungsi hemapoiesis akan diambil alih oleh sum sum tulang, begitu juga pada masa bayi, anak-anak, dan dewasa. Namun demikian, fungsi hemapoiesis limpa dapat muncul kembali karena faktor-faktor tertentu. Berfungsinya kembali hemopoiesis pada limpa disebut hemopoiesis ektramedular.⁹ Hemopoiesis ektramedular dapat terjadi akibat methemoglobinemia dan hemolisis spontan oleh eritrosit. Sodium nitrit sendiri dapat menyebabkan terbentuknya reaksi oksidatif yang menyebabkan terbentuknya methemoglobin dan lisis eritrosit. Selain itu, reaksi oksidatif tersebut juga dapat menyebabkan nekrosis pulpa putih limpa.⁸ Untuk mencegah efek tersebut, diperlukan antioksidan yang dapat mengurangi efek sodium nitrit. Antioksidan dapat diperoleh dari berbagai tanaman, salah satunya pegagan (*Centella asiatica*).

Pegagan adalah tanaman yang mengandung metabolit golongan triptepan dan mengandung flavonoid yang berperan sebagai antioksidan langsung atau modulator enzim yang membatasi pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Pengobatan Ayurvedic menggunakan pegagan sebagai obat malaria. Pada malaria, terjadi lisis eritrosit yang terkena parasit akibat terganggunya integritas membran eritrosit

tersebut. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Budiawan *et al* ditemukan bahwa pegagan dapat mengurangi nekrosis sel limpa yang diinduksi oleh infeksi *Salmonella typhi* melalui efek imunomodulatornya.^{10,11}

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun pegagan terhadap gambaran histopatologi limpa yang diinduksi oleh sodium nitrit subakut.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *post test control group design*. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor protokol 10/A/III/15.

Jumlah hewan coba yang digunakan sesuai dengan rumus *Festing* yaitu jumlah sampel sama dengan jumlah total hewan coba dikurangi jumlah kelompok =10 sampai dengan 20.¹² Pada penelitian ini digunakan hewan percobaan berupa 15 ekor tikus dewasa (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi sampel dalam penelitian ini yaitu tikus jantan yang sehat dan tidak cacat, berumur 3 bulan dengan berat badan 175-300gram. Penentuan tikus sehat berdasarkan hasil laboratorium darah tikus berupa kadar hemoglobin. Kriteria eksklusi sampel dalam penelitian ini yaitu tikus yang sakit dan mati selama perjalanan penelitian.

Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok secara random, yaitu kelompok kontrol (K), perlakuan 1 dengan dosis NaNO₂ 50 mg/kgBB/hari (P1) dan perlakuan 2 (P2) dengan dosis NaNO₂ 50 mg/kgBB/hari dan ekstrak etanol daun pegagan 600 mg/kgBB/hari.

Natrium nitrit dibuat larutan stok dengan perbandingan 0,50 gram dilarutkan dalam 100 ml aquades. Pada tikus uji dengan berat 100 gr diberikan 1 ml larutan stok peroral. Perlakuan per oral dilakukan selama

42 hari. Volume larutan stok yang diberikan pada tikus putih uji disesuaikan dengan berat badan harian. Pengukuran berat badan dilakukan setiap hari selama perlakuan. Berat badan yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan larutan stok NaNO₂ yang harus diberikan pada masing-masing tikus uji. Pakan dan minum diberikan setiap hari *ad libitum* yang ditempatkan pada kandang individu sehingga sisa pakan dapat ditimbang. Setiap hari diberikan pakan 25 g pada masing-masing tikus uji.

Determinasi daun pegagan dilakukan di Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia. Pengumpulan dan pembuatan serbuk daun pegagan dilakukan di Hebal Farma Merapi Kaliurang Yogyakarta. Pembuatan ekstrak etanol daun pegagan dilakukan di LPPT UGM.

Sampel pegagan yang sudah kering diserbuk menggunakan mesin penyerbuk dengan diameter lubang saringan 1 mm. Kemudian serbuk pegagan ditimbang, ditambah etanol 70%, diaduk selama 30 menit, didiamkan 24 jam, kemudian disaring (diulang 2 kali). Setelah itu filtrat diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pemanas *waterbath* suhu 70°C. Ekstrak kental lalu dituang dalam cawan porselin. Kemudian dipanaskan dengan *waterbath* suhu 70 °C sambil terus diaduk. Ekstrak pegagan kemudian diberikan untuk perlakuan dalam penelitian.

Satu hewan coba dipelihara di dalam 1 kandang berukuran (40x20x20) cm³. Suhu dalam kandang diatur pada suhu kamar. Pencahayaan dalam kandang diatur dengan siklus terang gelap selama 12 jam.

Pengambilan jaringan limpa tikus dilakukan pada hari ke 42. Tikus dibius menggunakan *chloral hidrat* 3,5% dalam akuadest dengan dosis 1 cc/100 gram berat badan tikus. Organ limpa diambil dan difiksasi dengan larutan 2% paraformaldehid untuk kemudian dibuat preparat histologi menggunakan pewarnaan hematoksilin eosin (HE).

Masing-masing sampel dibuat 2 preparat kemudian pengamatan dilakukan pada semua lapangan pandang secara

vertikal oleh peneliti. Pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi FK UII dengan menggunakan mikroskop CX41 dengan perbesaran 10x. Pembacaan diamati secara *blind* tanpa melihat kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Luas pulpa putih pada setiap kelompok kemudian diukur dengan menggunakan program *Image-J* dalam skala yang sama kemudian dibandingkan. Luas yang dihitung adalah seluruh area pulpa putih dan apabila terdapat arteri sentralis maka luas pulpa putih dikurangi dengan luas arteri sentralis. Semua luas pulpa putih dalam satu organ limpa kemudian dihitung rata-ratanya untuk dianalisis secara statistik. Perhitungan luas limpa sesuai dengan rumus di bawah.

$$\text{Luas} = \frac{(A-B) + C + \dots}{n}$$

Keterangan :

- A : luas pulpa putih dengan arteri sentralis
- B : luas arteri sentralis
- C : luas pulpa putih tanpa arteri sentralis
- n : jumlah pulpa putih yang diamati dalam satu organ limpa

Normalitas data diuji dengan uji *Saphiro-Wilk*. Homogenitas data diuji dengan uji variansi *Levene*. Data dengan distribusi normal dan variansi homogen kemudian diuji dengan uji *one way ANOVA* sedangkan data dengan distribusi tidak normal atau variansi yang tidak homogen diuji dengan uji *Kruskal-Wallis*.

Hasil

Subjek penelitian telah memenuhi kriteria inklusi yaitu tidak cacat dan sehat yang ditunjukkan dengan data berat badan dan kadar Hb. Dari data berat badan dan kadar Hb semua tikus sampel sebelum penelitian, tidak ditemukan perbedaan bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa semua sampel homogen sebelum penelitian.

Tabel 1. Data Rata-rata Berat Badan Tikus Sebelum Perlakuan

Kelompok	Rata-rata ± SD (g)	P-value
Kontrol	241 ± 37,84	
PI	233,26 ± 15,63	> 0,05
PII	236,8 ± 15,57	

Tabel 2. Data Rata-rata Kadar Hemoglobin Tikus Sebelum Perlakuan

Kelompok	Rata-rata ± SD (g/dL)	P-value
Kontrol	13,92 ± 2,44	
Perlakuan 1	14,36 ± 0,88	0,722
Perlakuan 2	14,74 ± 0,88	

Tabel 3. Data Rata-rata Luas Pulpa Putih Limpa Tikus

Kelompok	Luas Rata-rata ± SD (µm ²)	P-value
Kontrol	241400,78 ± 130181,51	
PI	218778,82 ± 52694,67	0,899
PII	243497,08 ± 80890,76	

Perbedaan luas pulpa putih tiap kelompok diuji secara statistik dengan *one way ANOVA*. Dari hasil pengujian didapatkan p=0,899 yang menunjukkan bahwa perbedaan rerata luas pulpa putih antar kelompok tidak signifikan (p>0,05).

Pembahasan

Pulpa putih adalah struktur di dalam limpa yang berisikan limfosit T dan limfosit B. Sel-sel limfosit di dalam pulpa putih dapat mengalami nekrosis salah satunya karena akumulasi lipid peroksidase. Lipid peroksidase dapat terbentuk dari adanya ROS yang merupakan oksigen reaktif dan bersifat toksik bagi sel. Nekrosis sel limfosit dapat disebabkan oleh hipoksia dan stres karena dalam kondisi tersebut dilepaskan glukokortikoid endogen.¹³ Stres oksidatif sendiri merupakan keadaan ketidakseimbangan antara peroksidan dan antioksidan. Hal tersebut terjadi karena kurangnya antioksidan atau berlebihnya produksi radikal bebas. Terbentuknya senyawa oksigen reaktif mengakibatkan terjadinya modifikasi lipid, deoxyribose-nucleic acid (DNA), dan protein pada berbagai jaringan. Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut akan mengakibatkan kerusakan-kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stres oksidatif. Stres oksidatif sendiri merupakan penyebab terjadinya kerusakan jaringan dan nekrosis sel.¹⁴

Nekrosis sel limfoid dapat dilihat dari ukuran pulpa putih limpa. Luas pulpa putih limpa yang membesar menunjukkan adanya hiperplasi sel-sel limfoid.¹⁵ Tingkat proliferasi sel limfosit juga dapat diukur secara kuantitatif dengan mengukur rerata diameter pulpa putih. Sel limfosit yang nekrosis akan menyebabkan jumlah sel limfosit dalam pulpa putih berkurang sehingga diameter pulpa putih akan menyusut.¹⁴

Dari hasil penelitian diperoleh bahwa rerata luas pulpa putih pada kelompok PI lebih kecil dibandingkan pada kelompok kontrol. Setelah dilakukan uji statistik, perbedaan tersebut tidak bermakna secara signifikan. Pemberian sodium nitrit pada tikus menyebabkan akumulasi lipid peroksidase pada sel limfosit. Lipid peroksidase akan mempengaruhi fluiditas membran, *cross-linking* membran, serta struktur dan fungsi membran.¹⁴ Hal tersebut menyebabkan nekrosis sel limfosit yang menyebabkan jumlah sel limfosit di dalam pulpa putih berkurang sehingga rerata luas pulpa putih pada PI lebih kecil dibanding rerata luas pulpa putih pada kelompok kontrol. Terjadinya nekrosis sel limfosit pada limpa didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Aita & Mohammed (2014)⁸, dimana dalam penelitian tersebut pemberian sodium nitrit selama 2 bulan menyebabkan deplesi elemen limfoid pulpa putih. Dalam penelitian tersebut juga disebutkan bahwa salah satu efek sodium nitrit terhadap limpa adalah mengecilnya ukuran folikel pulpa putih yang sejalan dengan lebih kecilnya rerata luas pulpa putih pada penelitian ini. Berbeda dengan penelitian Sharm & Sharma (2012)⁷, pemberian nitrat yang kemudian akan direduksi menjadi nitrit di dalam tubuh menunjukkan hasil kongesti pulpa putih dan tidak dijelaskan apakah ada nekrosis sel limfosit atau tidak.

Perbedaan yang tidak signifikan dimungkinkan akibat waktu penelitian yang cukup singkat. Pada penelitian Aita & Mohammed (2014) dimana ditemukan nekrosis fokal dan deplesi elemen limfoid, penelitian dilakukan selama dua bulan.

Penelitian terkait yang dilakukan oleh Sharm & Sharma (2012) juga memakan waktu cukup lama yaitu 120 hari.

Pada kelompok PII menunjukkan hasil rerata luas pulpa putih limpa yang lebih besar dibandingkan dengan rerata luas pulpa putih pada kelompok PI. Rerata luas pulpa putih pada kelompok PII juga hampir sama dengan rerata luas pulpa putih pada kelompok kontrol. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya flavonoid yang mampu mencegah aktivitas radikal bebas yang memperlambat proses inflamasi melalui berbagai mekanisme, salah satunya dengan menstabilkan komponen dari radikal bebas.¹⁰ Ekstrak etanol daun pegagan juga dapat berperan sebagai imunostimulator salah satunya dibuktikan dengan efeknya yang meningkatkan kadar IFN γ .¹⁶ Kandungan daun pegagan yang mungkin dapat berperan sebagai imunomodulator adalah flavonoid dan kurkumin. Kurkumin sendiri bisa bermanfaat sebagai antiinfeksi. Dalam sebuah penelitian *in vivo* disebutkan bahwa kurkumin dapat memodulasi sistem imun dengan cara meningkatkan kemampuan proliferasi sel T.^{10,17}

Simpulan

Pemberian ekstrak etanol daun pegagan berpengaruh secara tidak bermakna terhadap gambaran histopatologi tikus yang diinduksi dengan sodium nitrit sub akut.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan variasi dosis ekstrak etanol daun pegagan untuk mengetahui dosis efektif yang dapat mencegah efek sodium nitrit secara signifikan.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek imunomodulator pegagan khususnya efeknya terhadap sel-sel yang ada di dalam pulpa putih limpa.

Daftar Pustaka

1. Sharke FH, Marko SI, Haylock RW. Quantification of toxin-encoding mRNA from *Clostridium botulinum* type E in media containing sorbic acid or sodium nitrite by competitive RT-PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 232(2):139-44.
2. Hasna HN, Dyah S. Analisis kandungan nitrit dalam sosis pada distributor sosis di Kota Yogyakarta tahun 2011. *KesMas Jurnal Kesehatan Masyarakat.* 2012; 6(1):1-12.
3. Husni E, Samah A, Ariati R. Analisa zat pengawet dan protein dalam makanan siap saji sosis. *Jurnal sains dan teknologi farmasi.* 2007; 12(2):108-11.
4. National Toxicology Program, Toxicology and Carcinogenesis Studies of Sodium Nitrite. Public Health Service National Institutes of Health [internet]. 2001 [disitasi tanggal 9 Agustus 2017]; 495:273-7. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563346>
5. Manampiring AE. Studi kandungan nitrat (no-3) pada sumber air minum masyarakat kelurahan rurukan Kecamatan tomohon timur Kota Tomohon [disertasi]. Manado: Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi; 2009.
6. Sadeq M, Moe CL, Attarassi B, Cherkaoui I, Elaouad R, Idrissi L. Drinking water nitrate and prevalence of methemoglobinemia among infants and children aged 1-7 years in Moroccan areas. *Int J Hyg Environ Health.* 2008;211(5-6):546-54.
7. Sharm MK, Sharma H, Experimental Data of Respiratory and Circulatory Responses with Histopathological Changes of Limpa to High Nitrate Ingestion in Rabbits. *Int J Bio Med Res.* 2012; 3(1): 1294-8.
8. Aita NAA, Mohammed FF, Effect Of Marjoram Oil On The Clinicopathological, Cytogenetic And Histopathological Alterations Induced By Sodium Nitrite Toxicity In Rats. *Global Veterinaria.* 2014;12(5):606-16.
9. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH, Kapita Seleka Hematologi (ed. 4), Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2012.
10. Budiawan IGO, Suwiti NK, Suastika IP, Besung INK, Pengaruh Pemberian Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Gambaran Mikroskopis Limpa Mencit yang Diinfeksi *Salmonella typhi*. *Buletin Veteriner Udayana.* 2013;5(1):15-21.
11. Manasa MR. Experimental Evaluation of Anticonvulsant Activity of Hydrocotyle Asiatica Linn (*Centella asiatica*) in Albino Mice. *Pushpagiri Medical Journal.* 2012;3(2):128-31.
12. Charan J. dan Kantharia, N.D. How to Calculate Sample Size in Animal Study. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics.* 2013;4(4):303-6.
13. Frith CH, Ward JM, Chandra M, Losco PE. Non-proliferative Lesions of the Hematopoietic System in Rats, *Guides for Toxicologic Pathology*, Washington, DC, 2000.
14. Anggarasari Y, Luqman EM, Poernomo B, Handijatno D, Pengaruh Pemaparan Karbofuran Terhadap Gambaran Diameter Pulpa Putih Limpa Mencit (*Mus Musculus*), *Veteran Medika*, 2014.
15. Suttie. *Histopathology of the Spleen, Toxicologic Pathology*, Society of Toxicologic Pathology, 2006.
16. Trapika SC, Mustofa, Sholikhah EN, Effect of Pegagan Leave (*Centella Asiatica* [L. Urban] Ethanol Extract on IFN- γ Secretion on the Spleen of Balb/C Mice that Infected with *Listeria Monocytogenes*, International Conference : Research and Application on Traditional Complimentary and Alternative Medicine in Health Care (TCAM), Surakarta, Indonesia, 2012.
17. Khairinal. Efek Kurkumin terhadap Proliferasi Sel Limfosit dari Limpa Mencit C3H Bertumor Payudara Secara In Vitro [tesis]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Pascasarjana, Universitas Indonesia. Depok. 2012.