

## Efek toksisitas ekstrak pegagan (*Centella asiatica* Linn.) pada organ dan jaringan mencit (*Mus musculus*)

### Toxicity effect of *Centella asiatica* Linn. extract on mice (*Mus musculus*) organ and tissue

Praptiwi<sup>\*</sup>), Dewi Wulansari and Chairul

Botany Division, Research Center for Biology, Cibinong - Indonesia

#### Abstrak

Uji toksisitas pada ekstrak air pegagan (*Centella asiatica* Linn) telah dilakukan. Ekstrak diberikan pada mencit (*Mus musculus*) secara oral, dosis tunggal dan harian. Pengaruhnya pada organ dan jaringan dievaluasi dengan mengamati patologi dan anatomi dari jantung, hati dan ginjal serta nilai LD<sub>50</sub>. Perlakuan dosis rendah ternyata semua organ yang diamati masih dalam keadaan normal, tetapi pada dosis tinggi mengakibatkan terbentuknya noda putih pada hati, noda hitam pada jantung sedangkan pada ginjal terbentuk noda putih. Pengamatan histo-patologi menunjukkan bahwa pada pemberian ekstrak dosis rendah semua jaringan yang diamati masih dalam keadaan normal, tetapi pada dosis tinggi mengakibatkan kerusakan pada jaringan otot dan inti sel pada jantung, sedangkan warna hati berubah menjadi merah bata dan terdapat noda putih (disebabkan oleh adanya kerusakan sel dan akumulasi leukosit). Degenerasi dan konstensi sinusoid terjadi pada jaringan hati, sedangkan pada ginjal mengakibatkan nekrosis dan degenerasi protein karena kerusakan membran pada glomerulus. Nilai LD<sub>50</sub> ekstrak pegagan adalah 13,6 g/kg BB. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak pegagan termasuk dalam kategori toksisitas rendah (5-15 g/kg BB) sehingga penggunaannya pada fitoterapi harus dengan pengawasan seorang ahli dan diberikan pada dosis rendah dalam jangka waktu yang pendek.

**Kata kunci :** *Centella asiatica* Linn; ekstrak; toksisitas akut dan subkronik, patologi anatomi

#### Abstract

Toxicity test of *Centella asiatica* Linn. water extract had been carried out. Extract were administered via oral, single and daily doses in mice (*Mus musculus*). The effect of extract on organs and tissue were evaluated by observing the pathology anatomy of heart, liver and kidney and also LD<sub>50</sub> value. The influences of acute and sub-chronic toxicity on morpho-anatomy organs and histo-pathology tissue were in accordance with LD<sub>50</sub> experiment. The results of morpho-anatomy showed that all organs were still in normal condition at low dose treatment, but stain and white spots appeared on liver, black spot on heart and white spots on kidney at higher dose. Histo-pathology indicated that low dose administration of extract resulted that, all of tissue observed were in good and normal condition, but at higher dose resulted injure of muscle fibres and also injure of nucleus cells of heart tissue also the colour of liver tissue was brick red and white stain manifestation (because the damaged of cells and accumulation of leucocytes). Degeneration and congestive sinus occurred in liver tissue, while necrosis and protein degeneration formed in kidney because of glomerulus membrane damaged. LD<sub>50</sub> of *Centella* extract was 13.6 g/kg. This dose indicated that *Centella* extract is slightly toxic (5 - 15 g/kg), so that it is suggested that if it was used in phyto-therapy had to

be under supervision of an expert or specialist and administered in low dose and short period.

**Keywords** : *Centella asiatica* Linn; extract; acute and subchronic toxicity; anatomy pathology

## Pendahuluan

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan herba yang menjalar. Daerah penyebarannya cukup luas, dari daerah Asia tropis dan juga Indonesia. Pegagan telah lama dikenal dan dimanfaatkan sebagai bahan obat tradisional, antara lain untuk penyakit kulit, sistem syaraf, lepra, hati (Chaudory, 1978; Sjamsoe-Daili, 2002), diuretika, antibakteri, epilepsi, hemoroid, disentri, dan rheumatik (Winarto, 2003), juga berguna untuk meningkatkan daya ingat pada lansia dan juga sebagai obat untuk penyakit lepra (Dash, 1995; Chaudory, 1978). Huang *et al.* (2004) menyatakan bahwa asiatikosida, yaitu senyawa triterpene yang diekstraksi dari pegagan dapat merangsang terjadinya apoptosis dan meningkatkan aktivitas antitumor vincristine pada sel kanker sehingga terdapat kemungkinan berguna untuk khemoterapi pada penderita kanker.

Dalam pengembangan obat herbal sebagai fitofarmaka diperlukan beberapa persyaratan seperti kualitas, keamanan dan efikasi (Loedin, 1999). Penelitian ini dilakukan untuk mengamati keamanan penggunaan ekstrak air pegagan dengan melakukan uji toksisitas akut ( $LD_{50}$ ) dan subkronis pada mencit dan pengaruhnya terhadap organ dan jaringan yang dievaluasi dengan mengamati histopatologi dan anatomi jantung, hati, dan ginjal mencit.

## Metodologi

### Bahan

Pegagan (*C. asiatica* Linn.) dikoleksi dari kebun percobaan Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi. Identifikasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bogoriensis. Mencit (*Mus musculus*) yang digunakan adalah galur Deutshe De Yokka (DDY), diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner, Bogor, umur 2-3 bulan dengan berat 17-20 g.

### Ekstraksi

Herba kering pegagan (500 g) dimasukkan pada maserator kemudian ditambahkan 1 L air suling selanjutnya dipanaskan pada penangas air dengan suhu 60-70 °C selama 2 jam. Setelah

itudisaring dengan *Buchner funnel*, residunya dicuci dengan air panas (200 mL) tiga kali. Filtrat yang diperoleh dipekatkan pada penangas air dan ekstrak pekat dikeringkan dengan freeze dryer.

### Adaptasi hewan coba (Turner, 1965)

Lima kelompok mencit, dimana masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor (20-30 g) ditempatkan pada kandang, air dan pakan tersedia secara *ad-libitum*. Pada awal perlakuan mencit diberi antibiotika kemudian hari berikutnya diberi obat cacing. Setiap hari dilakukan penimbangan terhadap mencit. Masa adaptasi berlangsung selama 14 hari.

### Uji Toksisitas (Loomis, 1975)

#### Meridian Lethal Dose ( $LD_{50}$ )

Dua kelompok mencit, masing-masing terdiri dari 10 ekor digunakan untuk uji toksisitas. Satu kelompok diberi perlakuan ekstrak dosis rendah (20 %) dan kelompok lainnya diberi dosis tinggi (80 %), ekstrak diberikan secara oral melalui sonde lambung (1 mL). Jumlah kematian diamati selama 24 jam.

Prosedur yang sama dilakukan terhadap 5 kelompok mencit yang diberi konsentrasi ekstrak yang berbeda untuk memperoleh nilai *meridian lethal dose* ( $LD_{50}$ ). Jumlah kematian mencit pada masing-masing kelompok dicatat dan data yang diperoleh dianalisis dengan program Finney. Mencit yang telah mati dibuka rongga abdomen untuk mengambil sampel jantung, hati dan ginjal yang kemudian difiksasi dengan Buffer neutral Formalin 10 % (BNF 10 %) pada suhu ruang selama 48 jam.

### Toksisitas subkronis

Tiga kelompok yang masing-masing terdiri dari 10 ekor mencit digunakan untuk uji toksisitas subkronis. Perlakuan yang diberikan pada uji ini adalah : (1) ekstrak dengan dosis 10 % dari nilai  $LD_{50}$ , (2) 1/3 dosis dari pemberian dosis tunggal, (3) kelompok kontrol negatif.

Tabel I. Morfologi anatomi organ pada perlakuan ekstrak pegagan

Kelompok	Jantung	Hati	Ginjal
K-0	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
K-1	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
K-2	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
K-3	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
K-4	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah bata
K-5	Ukuran normal, merah tua, bintik hitam	Ukuran normal, warna merah bata, terdapat noda putih	Ukuran normal, noda putih, warna merah bata

Catatan : K-0 = Kontrol negatif; K-1= 5 g/kg; K-2 = 10 g/kg;  
K-3 = 15 g/kg; K-4 = 20 g/kg; K-5 = 25 g/kg BB

Pengamatan dilakukan selama 4 minggu. Tiap minggu dari masing-masing kelompok diambil 1 ekor untuk dilakukan nekropsi kemudian diambil sampel jantung, hati dan ginjal untuk pengamatan histopatologi dan anatomi.

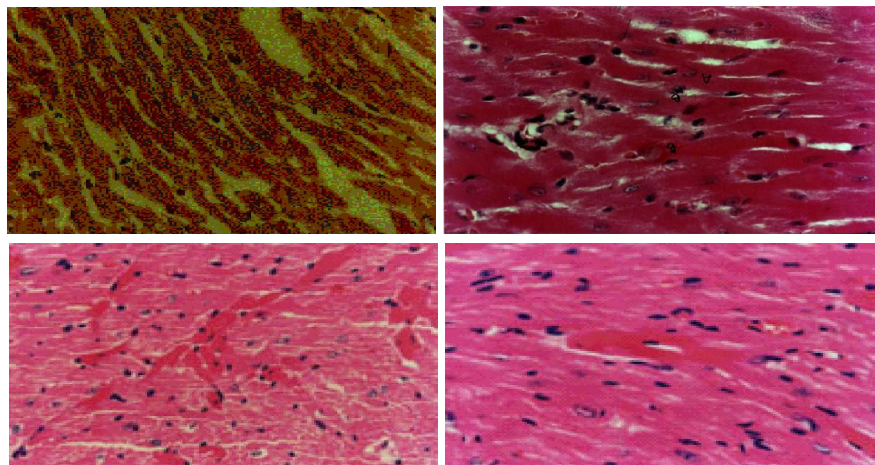
#### Histologi dan Patologi organ dan jaringan

Pengamatan histologi dilakukan terhadap jantung, hati dan ginjal dengan mengamati morfologi dan juga histopatologi dari jaringan pada organ tersebut. Organ yang diperoleh dicuci terlebih dahulu pada NaCl 0.9 % kemudian difiksasi dengan larutan BNF10 % (buffer neutral formalin) selama 48 jam, kemudian ditrimming dengan ketebalan 0,3 cm selanjutnya dimasukkan dalam *tissue cassette*. Jaringan selanjutnya didehidrasi dengan alkohol secara bertahap kemudian diinfiltrasi dengan paraffin dengan *automatic tissue processor* kemudian dilakukan embedding yaitu proses penanaman organ ke dalam paraffin dan dibiarkan hingga mengeras pada cetakan blok paraffin. Blok disimpan pada suhu 4-6 °C sebelum diiris dengan mikrotom, pada ketebalan 3 mikron kemudian diletakkan pada air hangat selanjutnya diletakkan diatas kaca objek, disimpan dalam inkubator selama 24 jam dilanjutkan dengan pewarnaan haematoxylin eosin (HE). Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran 400X. Pengaruh uji toksisitas akut dan subkronis pada jaringan diamati dengan membandingkan jaringan organ pada perlakuan kontrol negatif.

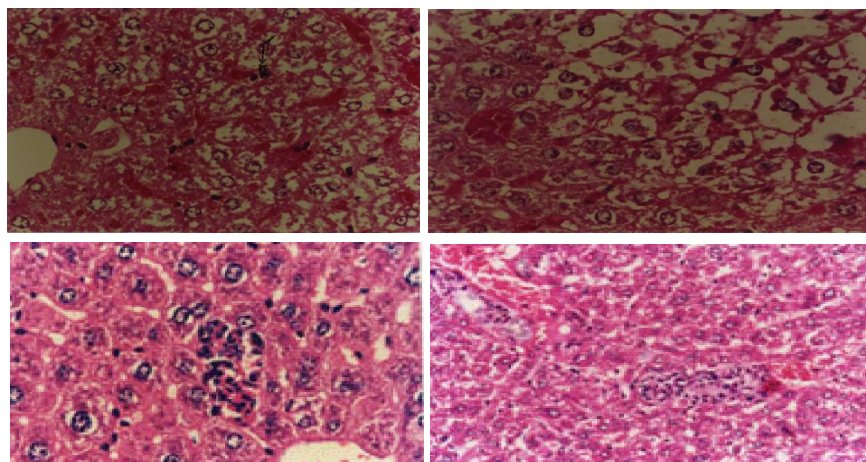
#### Hasil dan Pembahasan

Dosis rendah (10 g/kg BB) tingkat kematian adalah 20 % sedang pada dosis 25 g/kg BB tingkat kematian mencapai 80 %. Setelah itu 5 kelompok mencit diberi ekstrak dengan dosis 5, 10, 15, 20 dan 25 g/kg BB, dan berdasarkan tingkat kematian dari masing-masing kelompok tersebut dihitung nilai LD<sub>50</sub> dari ekstrak pegagan dengan program Finney (Tabel I). Nilai LD<sub>50</sub> ekstrak pegagan yaitu 271,91 mg/20 g BB

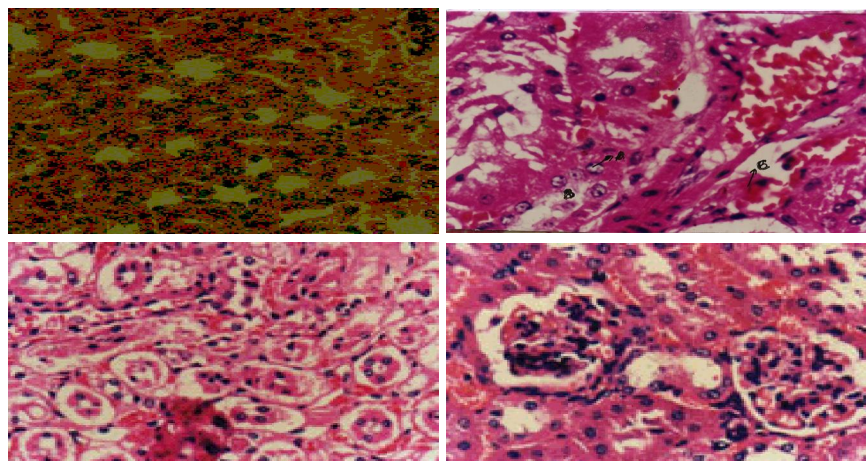
Berdasarkan pengamatan morfologi-anatomi dari organ menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pada dosis sampai dengan 15 g/kg BB (K3) belum mengakibatkan perubahan morfologi dan anatomi organ, tetapi dosis ekstrak 20 g/kg BB (K4) dan 25 g/kg BB (K5) mengakibatkan timbulnya noda-noda dan titik berwarna putih pada hati (Gambar 2), dan K5 juga mengakibatkan adanya noda hitam pada hati



Gambar 1. Pengaruh toksisitas akut dan subkronis ekstrak pegagan pada jaringan jantung.



Gambar 2. Pengaruh toksisitas akut dan subkronis ekstrak pegagan pada jaringan hati.



Gambar 3. Pengaruh toksisitas akut dan subkronis ekstrak pegagan pada jaringan ginjal

Tabel II. Pengaruh ekstrak pegagan terhadap histopatologi pada jaringan organ

Kelompok	Jantung	Hati	Ginjal
K-0	Sel normal, tersusun baik	Lobus tersusun baik, batas antar lobus jelas	Glomerulus dan tubuli baik dan normal
K-1	Sel normal, tersusun baik	Lobus tersusun baik, batas antar lobus jelas	Protein pada tubuli
K-2	Sel normal, tersusun baik	Lobus tersusun baik, batas antar lobus jelas	Protein pada tubuli
K-3	Kerusakan pada jaringan otot dan inti sel	Degenerasi dan konjesti pada sinusoid	Nekrosis, degenerasi protein pada tubuli
K-4	Kerusakan pada jaringan otot dan inti sel	Degenerasi dan konjesti pada sinusoid	Nekrosis, degenerasi protein pada tubuli
K-5	Kerusakan pada serabut otot dan inti sel	Degenerasi dan konjesti pada sinusoid	Nekrosis, degenerasi protein pada tubuli

Notes : K-0 = control negatif; K-1= 5 g/kg; K-2 = 10 g/kg;  
 K-3 = 15 g/kg; K-4 = 20 g/kg; K-5 = 25 g/kg **BB**  
 K-2 = Dosis tunggal 27,20 mg/20 g

(Gambar 1) dan noda putih pada ginjal (Tabel II dan Gambar 3). Pengamatan histopatologi pada jaringan organ menunjukkan bahwa pemberian ekstrak sampai dengan 10 g/kg BB (K2) semua jaringan masih dalam keadaan normal, tetapi pada dosis lebih tinggi (15-25 g/kg BB) terdapat kerusakan pada jaringan otot dan inti sel pada jantung, sedangkan hati mengalami perubahan warna menjadi merah bata dan adanya noda putih. Hal ini disebabkan adanya kerusakan pada sel dan adanya akumulasi sel darah putih (leukosit). Pada dosis tersebut juga terjadi degenerasi dan konjesti sinusoid pada jaringan hati, sedangkan pada ginjal terjadi nekrosis dan degenerasi protein. Terbentuknya degenerasi protein pada sel disebabkan membran pada glomerulus mengalami kerusakan sehingga fungsi glomerulus juga hilang (Loomis, 1975) (Table II).

Uji toksisitas subkronis dilakukan dengan pemberian ekstrak pada dosis tunggal 27,2 mg/20 g B B(10 % dari LD<sub>50</sub>) dan dosis berulang 9. 07 mg/20 g BB (1/3 dari dosis tunggal). Pengamatan morfologi dan anatomi organ menunjukkan adanya perubahan yang

nyata pada tiap minggu pengamatan. Semua organ (jantung, hati dan ginjal) masih dalam keadaan normal pada minggu pertama dan kedua pengamatan, tetapi pada minggu berikutnya terjadi perubahan terutama pada hati dan jantung. Pada minggu ketiga, ukuran jantung menjadi lebih kecil. Pada perlakuan K1 dan K2 mengakibatkan munculnya noda atau bercak pada hati dan ukuran hati menjadi lebih kecil pada perlakuan K2, sedangkan pengamatan pada minggu ke 4 menunjukkan perubahan warna pada hati menjadi merah tua pada perlakuan K1. Pengamatan pada ginjal sampai minggu ke-4 menunjukkan terjadinya perubahan warna yaitu merah tua dan timbulnya noda atau bercak pada perlakuan K2 (Tabel III).

Histopatologi jaringan organ pada uji toksisitas subkronis menunjukkan adanya perubahan pada jaringan akibat perlakuan

Tabel III. Pengaruh toksisitas subkronis terhadap morfologi dan anatomi organ

Minggu	Klp	Jantung	Hati	Ginjal
I	K-0	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
	K-1	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
	K-2	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
II	K-0	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
	K-1	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
	K-2	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
III	K-0	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
	K-1	Ukuran normal, warna coklat kemerahan, noda hitam	Ukuran normal, coklat kemerahan, terdapat noda hitam	Ukuran normal, warna merah
	K-2	Ukuran mengecil, coklat kemerahan, noda hitam	Ukuran mengecil, coklat kemerahan, noda hitam	Ukuran normal, warna merah
IV	K-0	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna coklat kemerahan	Ukuran normal, warna merah
	K-1	Ukuran kecil, warna merah tua, titik hitam	Ukuran kecil, warna merah tua	Ukuran normal, warna merah tua
	K-2	Ukuran kecil, warna merah tua, noda hitam	Ukuran kecil, warna merah tua, noda hitam	Ukuran normal, warna merah tua, noda hitam

Catatan : K-0= Kontrol negatif; K-1= dosis berulang 9,07 mg/20 g ;

K1 dan K2. Pada minggu pertama pemberian ekstrak pegagan pada perlakuan K1 mengakibatkan perluasan sinusoid dan vena sentralis pada hati sedangkan perlakuan K2 menunjukkan adanya pendarahan pada sinusoid dan vena sentralis. Pada minggu ke-4 terjadi kerusakan sel, degenerasi dan konjesti vena sentralis pada perlakuan K1 dan K2.

Jaringan otot pada jantung mengalami kerusakan mulai minggu ke 2 perlakuan, sedangkan pada ginjal terjadi pendarahan pada tubuli, degenerasi pada sel epitelium, degenerasi protein dan nekrosis pada tubuli (K-1 dan K-2) mulai minggu pertama (Table IV.).

Perubahan yang terjadi pada organ akibat pemberian ekstrak pegagan disebabkan adanya kandungan kimia pada ekstrak tersebut, misalnya saponin, turunan triterpenoid (asam asiatika, dan asam brahmida) dan ion potasium (K) (Tang, 1992). Saponin merupakan komponen utama ekstrak pegagan yang dapat menyebabkan hemolisis dan menurunkan tekanan permukaan sehingga dapat mengakibatkan kerusakan pada sel dan

Tabel IV. Histopatologi jaringan organ pada uji toksisitas subkronis

Minggu	Klp	Jantung	Hati	Ginjal
I	K-0	Sel dan jaringan normal	Lobus tersusun dengan batas antar lobus jelas	Glomerulus dan tubuli normal
	K-1	Sel dan jaringan normal	Perluasan sinusoid dan vena sentralis	Pendarahan pada tubuli dan degenerasi sel epitelium
	K-2	Sel dan jaringan normal	Pendarahan pada sinusoid dan vena sentralis	Pendarahan pada tubuli, protein pada lumen dan nekrosis
II	K-0	Sel dan jaringan normal	Lobus tersusun dengan batas antar lobus jelas	Glomerulus dan tubuli normal
	K-1	Kerusakan pada jaringan otot	Pendarahan pada sinus	Pendarahan pada tubuli
	K-2	Kerusakan pada jaringan otot	Kerusakan sel	Degenerasi protein dan nekrosis pada tubuli,
III	K-0	Sel dan jaringan normal	Lobus tersusun dengan batas antar lobus jelas	Glomerulus dan tubuli normal
	K-1	Kerusakan pada serabut otot	Degenerasi, konjesti pada vena sentral dan kerusakan sel	Degenerasi protein dan nekrosis pada tubuli
	K-2	Kerusakan pada serabut otot	Degenerasi, konjesti pada vena sentralis dan kerusakan sel	Degenerasi protein dan nekrosis pada tubuli
IV	K-0	Sel dan jaringan normal	Lobus tersusun dengan batas antar lobus jelas	Glomerulus dan tubuli normal
	K-1	Kerusakan pada serabut otot	Degenerasi, konjesti pada vena sentral dan kerusakan sel	Degenerasi protein dan nekrosis pada tubuli
	K-2	Kerusakan pada serabut otot	Degenerasi, konjesti pada vena sentralis dan kerusakan sel	Degenerasi protein dan nekrosis pada tubuli

Catatan : K-0= Kontrol negatif; K-1= Dosis berulang 9,07 mg/20 g BB;  
K-2 = dosis tunggal 27,20 mg/20 g BB

jaringan otot, pendarahan pada sinusoid, nekrosis pada tubuli dan juga adanya perubahan warna pada organ. Kelebihan ion potasium (K) juga dapat menurunkan fungsi ginjal sehingga terjadi kerusakan pada glomerulus dan juga adanya degenerasi protein (Loomis, 1975; Ratnaningsih, 2000).

Nilai LD<sub>50</sub> ekstrak pegagan adalah 271,91 mg/20 g BB atau 13,6 g/kg BB. Dosis ini menunjukkan bahwa ekstrak pegagan

mempunyai sifat toksisitas rendah (5 - 15 g/kg) (Loomis, 1975; Tang, 1992). Mengingat pengaruhnya pada organ dan juga jaringan organ (jantung, hati dan ginjal) maka penggunaan ekstrak pegagan sebaiknya diberikan pada dosis rendah dan dalam waktu yang pendek.

## Kesimpulan

LD<sub>50</sub> dari ekstrak pegagan adalah 271,91 mg/20 g BB (13,6 g/kg BB), yang menunjukkan bahwa ekstrak pegagan toksisitasnya rendah (5 - 15 g/kg). Pengamatan pada toksisitas akut dan subkronis menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pegagan mengakibatkan perubahan pada organ jantung, hati dan ginjal antara lain timbulnya noda putih pada hati, noda hitam pada jantung, noda putih pada ginjal. Jantung dan hati mempunyai ukuran lebih kecil dibandingkan

perlakuan kontrol negatif dan juga perubahan warna pada organ. Histopatologi organ menunjukkan adanya kerusakan pada sel dan jaringan otot, pendarahan pada sinusoid, nekrosis pada tubuli, kerusakan pada glomerulus dan degenerasi protein.

Penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan untuk memperoleh nilai ED<sub>50</sub> ekstrak pegagan sehingga dapat diketahui dosis aman pemberian ekstrak pegagan.

## References

- Chaudory S, Ghosh S, Chakraborty T, Kundu S, and Hazra S. K., 1978. Use of a Common Indian Herb "Mandukaparni" in The Treatment of Leprosy, *J. Indian M.A* 70: 77-80.
- Dash B. 1995. *Ayurvedic Cures for Common Diseases*, Hind Pocket Book (P) Ltd.; 107.
- Huang, Y. H., Zhang S. H., Zhen R. X., Xu X. D., and Zhen Y. S. 2004. *Asiaticosida inducing apoptosis of tumor cells and enhancing anti-tumor activity of vincristine*. *Ai Zheng* 23, 12, 1599-1604.
- Loedin, A. A., 1999, *Peran riset dalam Pendayagunaan Potensi Obat Tradisional Sebagai Unsur Dalam Pelayanan Kesehatan Masyarakat*, Seminar sehari Pendayagunaan Potensi Obat Tradisional Sebagai Unsur Dalam Pelayanan Kesehatan Masyarakat, BPPT, 9 Maret 1999.
- Loomis T. A., 1975. Acute and Prolong Toxicity Test, *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 58; 645.
- Ratnaningsih A., 2000. *Pengaruh Kadmium Terhadap Gangguan Potologi pada hati dan ginjal hewan percobaan*, Thesis IPB; 27-49.
- Sjamsoe-Daili E. S., 2002. Pengobatan Ulkus Kusta dengan Obat Tradisional, *Berita IPTEK* 43, 1, LIPI; 57-64.
- Tang, W and Eisenbrand, G. 1992. *Chinese Drugs of Plants Origins; Chemistry, pharmacology and use in traditional and modern medicine*, Springer-Verlag, Berlin; 273-276.
- Turner R. A., 1965. *Screening Methods in Pharmacology*, Academic Press, New York and London; 61-63.
- Winarto W. P, and Surbakti M., 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*, Agromedia Pustaka, 6-10.

---

\*<sup>1</sup>) koresponden Praptiwi  
Botany Division, Research Center for Biology, Cibinong - Indonesia  
Email :praptiwip@yahoo.com