

Efek Penurunan Ekspresi MHCII Pada Sel Mikroglia HMC3 Teraktivasi M₁ Polarity Oleh Fraksi *n*-Heksana dan Etil Asetat Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.)

Burhan Ma'arif^{1*}, Faisal Akhmal Muslikh², Abdul Malik Guhir¹, Hilwa Fitri¹, Luqman Alfani Najib¹, Novyananda Salmasfattah¹, Hening Laswati³, Mangestuti Agil⁴

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang

²Mahasiswa Magister Ilmu Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

³Departemen Ilmu Kedokteran Fisik dan Rehabilitasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya

⁴Departemen Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*) E-mail: (burhan.maarif@farmasi-uin.malang.ac.id)

ABSTRAK

Neuroinflamasi merupakan kondisi patologis pada sel saraf yang mengalami kehilangan fungsi secara progresif, salah satunya disebabkan defisiensi estrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa yang memiliki struktur dan fungsi yang mirip dengan 17 β -estradiol, bentuk alami estrogen yang paling poten. Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) diketahui mengandung senyawa fitoestrogen yang dapat menggantikan fungsi 17 β -estradiol dalam tubuh dalam menjaga homeostasis organ tubuh, sehingga potensial dikembangkan sebagai antineuroinflamasi. Penelitian ini bertujuan membuktikan aktivitas antineuroinflamasi fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat daun Semanggi secara *in vitro* pada sel mikroglia HMC3, melalui pengukuran ekspresi major *histocompatibility complex* II (MHC II). Kedua fraksi dengan konsentrasi 62,5; 125; dan 250 μ g/ml diberikan pada sel mikroglia HMC3 yang telah diinduksi *interferon gamma* (IFN- γ) selama 24 jam. Pengukuran ekspresi MHC II menggunakan metode *immunocytochemistry* (ICC) dan instrumen *confocal laser scanning microscopy* (CLSM). Hasil penelitian menunjukkan fraksi *n*-heksana dapat menurunkan ekspresi MHC II pada konsentrasi 250 μ g/ml pada $p < 0,05$, serta menunjukkan pola *non-monotonic dose response* (NMDR), sedangkan fraksi etil asetat dapat menurunkan ekspresi MHC II pada semua konsentrasi pada $p < 0,05$. Berdasarkan hasil uji korelasi, aktivitas antineuroinflamasi terbaik pada sel mikroglia HMC3 ditunjukkan oleh fraksi etil asetat daun Semanggi.

Kata Kunci : Fitoestrogen, *Marsilea crenata* Presl., MHC II, Sel Mikroglia HMC3.

Effects of Reduction of MHCII Expression on M₁ Polarity Activated HMC3 Microglia Cells By *n*-Hexane And Ethyl Acetate Fraction of Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) Leaves

ABSTRACT

*Neuroinflammatory is a pathological condition in which neuronal cells experience progressive loss of function, one of which is due to estrogen deficiency. Phytoestrogens are compound that has structure and function similar to 17 β -estradiol, the most potent natural form of estrogen. Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) is known to contain phytoestrogens which can replace the function of 17 β -estradiol in maintaining organ homeostasis, so that is potential to be developed as an anti-neuroinflammatory drug. This study was aimed to prove the anti-neuroinflammatory effect of the *n*-hexane and ethyl acetate fraction of Semanggi leaves on HMC3 microglia cells, by measuring the expression of major histocompatibility complex II (MHC II). Both fractions with a concentration of 62.5; 125; and 250 μ g/ml were administered to HMC3 microglia cells which had been induced by interferon gamma (IFN- γ) for 24 hours. Measurement of MHC II expression were using immunocytochemistry (ICC) methods and confocal laser scanning microscopy (CLSM) instruments. The results showed that *n*-hexane fraction could reduce MHC II expression at concentrations of 250 μ g/ml with $p < 0.05$, and showed a non-monotonic dose response (NMDR) pattern, while ethyl acetate fraction could reduce MHC II expression at all concentrations with $p < 0.05$. Based on the results of the correlation test, the best anti-neuroinflammatory activity on HMC3 microglia cells is showed by the ethyl acetate fraction of Semanggi leaves.*

Keywords: Phytoestrogens, *Marsilea crenata* Presl., MHC II, HMC3 Microglia Cell.

1. PENDAHULUAN

Pemanfaatan tumbuhan obat sebagai bahan obat merupakan bagian dari tradisi dari masyarakat Indonesia yang secara turun-temurun diwariskan dari generasi ke generasi [1]. Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) yang merupakan salah satu tanaman yang terkenal di Surabaya, Jawa Timur sebagai makanan khas masyarakat setempat diketahui memiliki kandungan fitoestrogen seperti genistein dan daidzein yang telah dibuktikan dari berbagai penelitian [2,3,4,5,6]. Fitoestrogen muncul sebagai sumber pengobatan alternatif untuk penyakit-penyakit akibat defisiensi estrogen, salah satunya penyakit neurodegeneratif yang ditandai dengan adanya neuroinflamasi pada otak [7,8,9].

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antineuroinflamasi fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat daun Semanggi dalam menghambat progresifitas neuroinflamasi yang ditandai dengan penurunan ekspresi *major histocompatibility complex II* (MHC II) pada sel *human microglial clone 3* (HMC3) [8,9]. Kondisi defisiensi estrogen diciptakan dengan induksi *interferon gamma* (IFN- γ) pada sel mikroglia HMC3 [10]. IFN- γ dapat mengaktifasi sel mikroglia HMC3 pada *classical pathway* menjadi keadaan *M₁ polarity*, dimana sel mikroglia HMC3 aktif bersifat proinflamasi [10,11]. Faktor penanda yang diamati yaitu MHC II, MHC II dipilih karena protein ini spesifik dihasilkan ketika sel mikroglia HMC3 teraktivasi *M₁ polarity* [12,13,14,15]. Pada penelitian ini, digunakan pelarut *n*-heksana karena pada penelitian sebelumnya fraksi *n*-heksana daun Semanggi diketahui dapat meningkatkan kepadatan tulang trabekular vertebra dan femur pada mencit betina. Aktivitas ini diduga disebabkan kandungan fitoestrogen di dalam daun Semanggi [16]. Sedangkan pelarut etil asetat dipilih karena pelarut etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa semi polar di dalam daun Semanggi. Diketahui mayoritas senyawa aktif pada tumbuhan di alam bersifat semi polar [17,18].

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan metode *immunocytochemistry* (ICC), yaitu metode identifikasi reaksi molekuler yang memanfaatkan reaksi antigen dengan antibody yang dianalisis dengan mikroskop dengan pembacaan label atau faktor penanda spesifik, dalam hal ini adalah MHC II [19]. Reaksi imunologis ini mampu memvisualisasi faktor penanda untuk pengamatan aktivitas dalam bentuk fluoresensi. Pengamatan reaksi antigen dan antibody yang dianalisis

menggunakan *confocal laser scanning microscope* (CLSM), yaitu suatu teknik mikroskopi non-invasif dalam menghasilkan gambar resolusi tinggi tiga dimensi dari sampel biologis baik sel ataupun jaringan, dengan prinsip fluoresensi protein yang terkandung dalam sel atau jaringan tersebut [20,21]. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan aktivitas antineuroinflamasi dari fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat daun Semanggi secara *in vitro* pada sel mikroglia HMC3, melalui pengukuran ekspresi *major histocompatibility complex II* (MHC II).

2. METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Daun Semanggi dipanen dari Kelurahan Benowo, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia pada September 2019 dan diidentifikasi di UPT Materia Medica, Batu, Jawa Timur, Indonesia dengan kunci determinasi 1a-17b-18a-1. Daun dikeringkan dan digiling untuk mempertahankan warna hijaunya. Pelarut *n*-heksana dan etil asetat diperoleh dari Merck (Darmstadt, Jerman), *fetal bovine serum* (FBS), *eagle's minimum essential medium* (EMEM), *dimethyl sulfoxide* (DMSO), antibodi sekunder, penisilin, dan streptomisin dibeli dari Abcam (Cambridge, Inggris). Reagen lainnya seperti *paraformaldehid* (PFA), tween 80, triton X-100 dari Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

2.2 Kultur Sel

Sel mikroglia HMC3 didapatkan dari *the American type culture collection* (ATCC) (Virginia, Amerika Serikat). Sel dikultur didalam flask 25 cm², yang mengandung 10% FBS, 1% penstrep yang digunakan untuk menghindari kontaminasi bakteri dan jamur, media komplit EMEM ± 5 ml. Kemudian dimasukkan ke dalam incubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C. Diinkubasi ± 60 hari.

2.3 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

Proses ekstraksi menggunakan metode *ultrasonic assisted extraction* (UAE). Ditimbang 900 g serbuk simplisia daun Semanggi ditambahkan 14,5 L etanol 96%, diekstraksi dengan *ultrasonic bath soltec* selama 3 x 2 menit. Selanjutnya disaring dan filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator Heidolph G3* pada suhu 50 °C. Hasil ekstrak etanol 96% kemudian dikeringkan di oven Memmert dengan suhu 40 °C.

Setelah didapatkan ekstrak etanol yang kering selanjutnya ekstrak yang didapatkan di lakukan fraksinasi dengan teknik partisi cair-cair dengan perbandingan (1:1). Ditimbang 70 gram ekstrak etanol 96% semanggi kemudian disuspensikan dengan air sebanyak 700 mL, setelah itu dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut *n*-Heksana sebanyak 700 mL, di gojok dan didiamkan sampai terdapat 2 fase, fase *n*-Heksana ditampung dan fase air dilakukan fraksinasi ulang sampai 10 kali. Hasil filtrate yang ditampung diuapkan dengan *rotary evaporator Heidolph G3* pada suhu 50 °C, kemudian dikeringkan di oven Memmert dengan suhu 40 °C.

Fase air dari proses terakhir dari fraksinasi *n*-Heksana, dilakukan proses fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat dengan metode yang sama dengan proses fraksinasi *n*-Heksana, filtrate yang ditampung diuapkan dengan *rotary evaporator Heidolph G3* pada suhu 50 °C, kemudian dikeringkan di oven Memmert dengan suhu 40 °C.

2.4 Pengukuran Ekspresi MHCII

Ditimbang fraksi *n*-heksana dan etil asetat masing-masing 50 mg, kemudian dicampur dengan 0,5% Tween 80 dan DMSO 0,5%, selanjutnya disuspensikan pada suhu kamar untuk menghasilkan larutan induk 5.000 µg/ml. Setiap sampel disaring menggunakan *Millipore* 0,22 µl. Larutan induk fraksi *n*-heksana dan etil asetat 5.000 µg/ml diencerkan dengan media komplit untuk menghasilkan konsentrasi akhir 62,5; 125; dan 250 µg/ml. Larutan sampel kemudian ditambahkan ke dalam *microplate* 24-well yang telah diisi dengan sel mikroglia HMC3 80% *confluence* selama 48 jam. Setelah itu medium komplit ditambahkan pada *microplate* 24-well, sel kemudian difiksasi dengan PFA 4% selama 15 menit. Kemudian dibilas dengan PBS selama 5 menit. Dibuang PBS, ditambahkan *blocking buffer* 300 µl dan ditunggu 20 menit. Dibilas dengan PBS, ditambahkan antibodi primer (*anti-rabbit* MHC II) 300 µl/well dan ditunggu 1 jam. Selanjutnya dibilas dengan PBS 3 x 5 menit, ditambahkan antibody sekunder (*anti-rabbit* FITC) 300 µl/well, ditunggu selama 45 menit dengan dilapisi aluminium foil. Kemudian, dibilas dengan PBS 3 x 5 menit. Intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 divisualisasikan dengan CLSM dan *Olympus Fluoview Ver.4.2a. software* pada panjang gelombang 488 nm. Hasil kuantifikasi berupa ekspresi MHC II

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

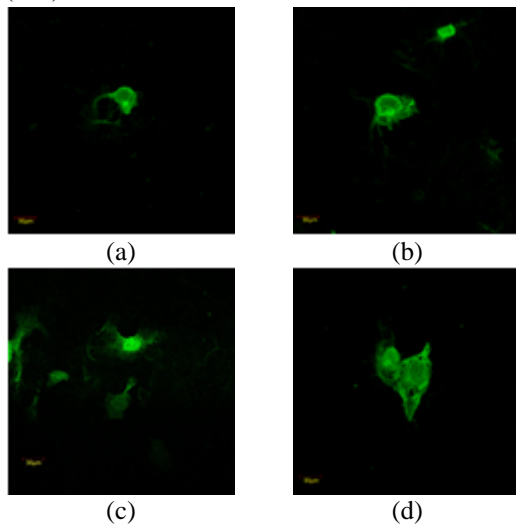
Neuroinflamasi pada sistem saraf pusat (SSP) terjadi karena kenaikan sel mikroglia yang teraktivasi M_1 *polarity* secara masif [14,22]. Neuroinflamasi muncul sebagai akibat dari kegagalan reaksi imun untuk menjaga homeostasis SSP [23]. Keadaan tersebut menyebabkan SSP mengalami keadaan patogenesis serta penumpukan senyawa-senyawa neurotoksik [24,25]. Penumpukan senyawa neurotoksik menginduksi produksi sitokin inflamasi secara tidak terkontrol yang mengakibatkan sel neuron dalam SSP mengalami kerusakan bahkan kematian [23], dan mengarah pada penurunan fungsi kognitif [26,27,28].

Mikroglia yang mengalami aktivasi tersebut bertindak sebagai *agent presenting cell* (APC) dan mengekspresikan protein seperti MHC II untuk melakukan lokalisasi inflamasi. Keadaan tersebut disertai dengan aktivasi sel B serta terjadinya penurunan permeabilitas *blood brain barrier* (BBB) akibat *metalloproteinase* yang dilepas mikroglia, sehingga mempermudah makrofag untuk memasuki SSP [29,30]. Ketidakmampuan mikroglia untuk melakukan eliminasi senyawa neurotoksik secara langsung menyebabkan makrofag melakukan fagositosis pada sel neuron yang mengalami kerusakan [23,25].

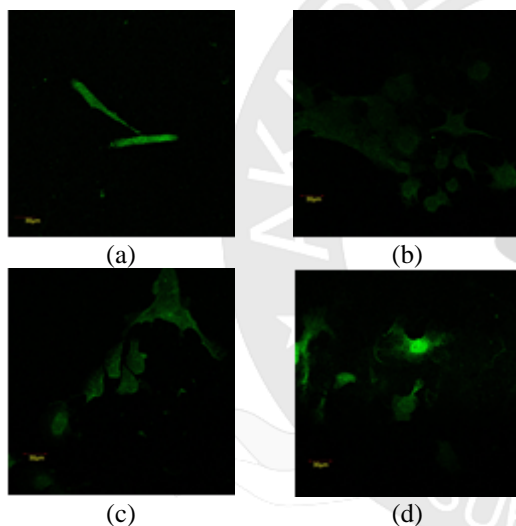
Pengujian *in vitro* aktivitas antineuroinflamasi pada fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat daun Semanggi dilakukan menggunakan metode ICC dan divisualisasikan menggunakan instrument CLSM. Metode ICC memungkinkan untuk mengevaluasi sel-sel dalam sampel tertentu yang dapat menghasilkan fluoresensi antigen yang diinginkan [31]. Hasil pengamatan metode ICC pada sel mikroglia HMC3 fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat dengan menggunakan instrument CLSM dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2 Semakin tinggi intensitas fluoresensi yang dihasilkan maka semakin tinggi ekspresi MHC II, demikian pula sebaliknya.

Hasil visualisasi dengan CLSM menunjukkan sel mikroglia HMC3 telah teraktivasi M_1 *polarity* setelah induksi oleh IFN- γ , yang ditunjukkan dengan morfologi sel yang ameboid, selain itu ditunjukkan dengan faktor petanda MHC II yang di ekspresikan dalam sel. Intensitas fluoresensi MHC II pada sel mikroglia HMC3 kemudian dianalisis secara kuantitatif dengan software Olympus Fluoview Ver.4.2a dan

diperoleh angka dengan satuan *arbitrary unit* (AU).



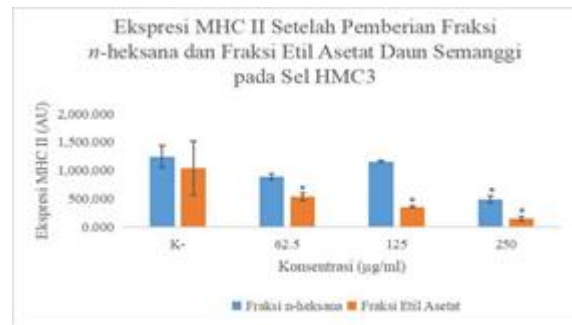
Gambar 1. Intensitas flouresensi MHC II fraksi *n*-heksana pada sel mikroglia HMC3 (a) kontrol negatif, (b) 62,5 µg/ml, (c) 125 µg/ml, (d) 250 µg/ml



Gambar 2. Intensitas flouresensi MHC II fraksi etil asetat pada sel mikroglia HMC3 (a) kontrol negatif, (b) 62,5 µg/ml, (c) 125 µg/ml, (d) 250 µg/ml

Hasil kuantifikasi tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil uji *one way analysis of variance* (ANOVA) menunjukkan pemberian fraksi *n*-heksana daun Semanggi dapat menurunkan ekspresi MHC II secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol negatif pada konsentrasi 250 µg/ml, dimana kontrol negatif merupakan kontrol media sel dengan IFN- γ tanpa penambahan sampel fraksi pada perlakuan, sedangkan uji ANOVA dari fraksi etil asetat daun Semanggi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dapat menurunkan ekspresi MHC II pada semua

konsentrasi dikarenakan memiliki nilai yang signifikan ($p < 0,05$).



Gambar 3. Ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC3 setelah pemberian fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat daun Semanggi Setiap nilai dinyatakan sebagai rata-rata \pm SD. *Berbeda signifikan dengan kontrol negatif pada $p < 0,05$.

Berdasarkan hasil tersebut, diketahui bahwa fraksi etil asetat secara umum memberikan hasil ekspresi MHC II yang relatif lebih rendah daripada fraksi *n*-heksana di semua kelompok perlakuan. Fraksi etil asetat juga memberikan respon penurunan ekspresi MHC II yang linier terhadap peningkatan konsentrasi, sedangkan respon linier tidak terdapat pada fraksi *n*-heksana. Hal ini disebabkan terjadinya fenomena *non monotonic dose responses* (NMDR) pada pemberian fraksi *n*-heksana.

NMDR ditandai dengan nilai slope yang berubah-ubah pada grafik di beberapa titik pada rentang konsentrasi yang menjadi perlakuan. NMDR umumnya terjadi pada penelitian uji aktivitas secara *in vitro* dan penelitian dengan sampel hormon atau senyawa pengganti hormon. Hal ini terjadi karena adanya perbedaan tingkat afinitas dan selektivitas hormon atau senyawa pengganti hormon dengan reseptornya, yang menyebabkan kesulitan dalam memperkirakan respon yang muncul dengan peningkatan konsentrasi [32,33,34,35,36]. Faktor lain yang dapat menyebabkan terjadinya NMDR ialah receptor downregulation dan desensitisasi reseptor. Hal ini dapat terjadi karena penambahan konsentrasi pada sampel dapat menyebabkan senyawa berikatan dengan reseptor lain selain *estrogen reseptor* (ER) atau membuat ER tidak sensitif dalam berikatan terhadap senyawanya. Namun, pada saat penambahan konsentrasi secara terus menerus dapat meningkatkan jumlah ER yang terdegradasi dan tidak sebanding dengan ER yang diproduksi, yang menyebabkan sel memproduksi ER secara masif dan dapat meningkatkan ikatan

senyawa dengan ER maupun respon aktivitasnya [36,37,38].

Uji korelasi selanjutnya dilakukan untuk mengetahui hubungan antara penambahan konsentrasi dengan intensitas fluoresensi MHC II. Uji korelasi dalam penelitian ini menggunakan uji korelasi Spearman, dikarenakan data bersifat non parametrik. Rentang nilai 0,00-0,24 menunjukkan korelasi sangat lemah, rentang nilai 0,25-0,49 menunjukkan korelasi lemah, rentang nilai 0,50-0,74 menunjukkan korelasi kuat, dan rentang nilai 0,75-1,00 menunjukkan korelasi sangat kuat [39]. Nilai plus atau minus menunjukkan tipe korelasi positif atau negatif. Hasil uji korelasi pada fraksi *n*-heksana didapatkan sebesar -0,216, sedangkan pada fraksi etil asetat didapatkan sebesar -0,821. Berdasarkan data tersebut, dapat diketahui bahwa korelasi paling baik ditunjukkan pada fraksi etil asetat dengan korelasi sangat kuat bernilai negatif. Sedangkan pada fraksi *n*-heksana, menunjukkan korelasi yang lemah dan bernilai negatif. Korelasi negatif ini sesuai dengan teori, dimana apabila terjadi peningkatan konsentrasi perlakuan, maka terjadi penurunan ekspresi MHC II.

Aktivitas antineuroinflamasi terjadi ketika senyawa fitoestrogen dalam fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat daun Semanggi menggantikan fungsi estrogen melalui mekanisme ER-dependent dan ER-independent [40,41,42]. Pada proses ini terjadi aktivasi sel mikroglia HMC3 pada alternative pathway dari kondisi resting state menjadi teraktivasi pada keadaan M_2 polarity dimana sel mikroglia HMC3 aktif bersifat antiinflamasi. Keadaan M_2 polarity ini menyebabkan penurunan ekspresi MHC II, sekaligus peningkatan ekspresi faktor petanda antiinflamasi seperti *arginase-1* (Arg1) [10]. Peningkatan ikatan fitoestrogen ER β pada jalur ER-dependent nuclear-initiated estrogen signaling dapat mengaktivasi ER β pada sitoplasma untuk bertranslokasi dalam nukleus, yang menyebabkan beberapa mekanisme seperti penghambatan aktivasi inhibitor of kappa B kinase (I κ K), penghambatan fosforilasi inhibitor of kappa B (I κ B), penghambatan aktivasi NF- κ B secara langsung, dan menginduksi downregulation gen human leukocyte antigen B27 (HLA-B27), yang menyebabkan penurunan produksi faktor petanda proinflamasi sekaligus meningkatkan produksi faktor petanda antiinflamasi [22,43,44]. Fitoestrogen pada daun Semanggi juga dapat bertindak melalui jalur ER-independent dengan

menghambat produksi nitrite oxide (NO) dan reactive oxygen species (ROS) secara langsung

4. KESIMPULAN

Pemberian fraksi *n*-heksana daun Semanggi pada konsentrasi perlakuan 250 μ g/ml, dan fraksi etil asetat daun Semanggi pada konsentrasi 62,5 μ g/ml, 125 μ g/ml dan 250 μ g/ml dapat menurunkan ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC3, sehingga kedua fraksi tersebut berkhasiat sebagai antineuroinflamasi. Berdasarkan uji korelasi, aktivitas antineuroinflamasi terbaik ditunjukkan oleh fraksi etil asetat daun Semanggi.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

-

6. PENDANAAN

-

7. KONFLIK KEPENTINGAN

Seluruh penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Radam, Rosidah, Soendjoto, Mochamad Arief., dan Prihatiningtyas, Eva. 2016. Pemanfaatan Tumbuhan yang Berkhasiat Obat oleh Masyarakat di Kabupaten Tanah Bumbu, Kalimantan Selatan. *Prosiding Seminar Nasional Lahan Basah* Jilid 2: 486-492.
2. Laswati, H. 2011. Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*, 47(2), 112-117.
3. Nurjanah., Azka, A., Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea crenata*). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*, 1(3), 152-158.
4. Ma'arif B, Agil, M, Laswati H. 2016. Phytochemical assessment on n-hexane extract and fractions of *Marsilea crenata* Presl.. leaves through GC-MS. *Trad. Med. J.* 21(2), 77-85.
5. Ma'arif, B., Agil, M., Laswati, H. 2018. Alkaline Phosphatase Activity of *Marsilea crenata* Presl.. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. *J App Pharm Sci*, 8(03), 55-59.
6. Trisunuwati, P. 2016. The Role of Leaf Water Clover (*Marsilea crenata*) Squeeze towards Estrogen Blood Level and Uterine Histology in Rats (*Rattus norvegicus*). *J. Ternak Tropika*, 17(2), 1-7.
7. Alldredge, B. K., Corelli, R. L., Ernst, M. E., Guglielmo, B. J., Jacobson, P. A., Kradjan, W. A., Williams, B. R. 2013. *Applied Therapeutics*. PA : Lippincot Williams Dan Wilkins.

8. Jantaratnotai, N., Utasincharoen, P., Sanvarinda, P., Thampithak, A. and Sanvarinda, Y., 2013. Phytoestrogens mediated anti-inflammatory effect through suppression of IRF-1 and pSTAT1 expressions in lipopolysaccharide-activated microglia. *International immunopharmacology*, 17(2), 483-488.
9. Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A. and Maggi, A., 2016. Estrogens, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Endocrine reviews*, 37(4), 372-402.
10. Cherry, J., Olschowka, J., and O'banion, Kerry. 2014. Neuroinflammation and M₂ microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, 11(98)
11. Mizuno, T., 2015. Neuron–microglia interactions in neuroinflammation. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 6(3), 225-231.
12. Klaassen, C., Watkins, J.B, 2015, Casarett & Doull's: Essential of Toxicology, McGrawHill Medical: New York.
13. Paracha, H., Hussain, T., Tahir, M.Z., Yasmeen, A., Pervez, M.T., Sheik, A.A., Haider, A., Ali, R., Khan, W.A., 2015, Multifunctional DRB3, a MHC Class II Gene, as a Useful Biomarker in Small Ruminants: A Review, *Journal of Infection and Molecular Biology*, 3 (1).
14. Matt, S.M., Johnson, R.W., 2015, Neuro-Immune Dysfunction During Brain Aging: New Insights in Microglial Cell Regulation, *Current Opinion In Pharmacology*, 26, 96–101.
15. Chamniansawat, S., Chongthammakun, S., 2015, Inhibition of hippocampal estrogen synthesis by reactive microglia leads to down-regulation of synaptic protein expression. *NeuroToxicology*, 46, 25–34.
16. Agil Mengestuti, Burhan Ma'arif, Aemi Nyimas Yusma., 2018. Aktivitas anti osteoporosis fraksi n-heksan daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekular vertebra mencit betina. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*, 1(2), 1-7.
17. Sari, D.K., D.H. Wardhani, dan A. Prasetyaningru., 2012. Pengujian Kandungan Total Fenolik Kappahycus Alvarezzi Dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik Dengan Variasi Suhu Dan Waktu. *Jurnal Jurusan Teknik, Universitas Hasyim Asyari*, 1(1), 40-44.
18. Joshi dan Nisha., 2019. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 3(28).
19. Brooks, S. A., Dwek, M., dan Schumacher, U., 2012. Basic Immunochemistry for Light Microscopy.
20. Stanciu, S.G., Hristu, R., Boriga, R. and Stanciu, G.A., 2010. On the suitability of SIFT technique to deal with image modifications specific to confocal scanning laser microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 16(5), 515-530.
21. Yang, X., Qin, L., Liang, W., Wang, W., Tan, J., Liang, P., Xu, J., Li, S. and Cui, S., 2014. New bone formation and microstructure assessed by combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Calcified tissue international*, 94(3), 338-347.
22. Au, A., Feher, A., McPhee, L., Jessa, A., Oh, S. and Einstein, G., 2016. Estrogens, inflammation and cognition. *Frontiers in neuroendocrinology*, 40, 87-100.
23. Chen, W.W., Zhang, X.I.A. and Huang, W.J., 2016. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular medicine reports*, 13(4), 3391-3396.
24. Tang, Y. and Le, W., 2016. Differential roles of M₁ and M₂ microglia in neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology*, 53(2), 1181-1194.
25. Brett, F.M. and Kearney, H., 2018. Neuropathology correlates of cognitive assessments. *Irish Journal of Medical Science*, 187(3), 835-844.
26. Block, M.L., Zecca, L. and Hong, J.S., 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 57-69.
27. Tao, L., Zhang, F., Hao, L., Wu, J., Jia, J., Liu, J.Y., Zheng, L.T. and Zhen, X., 2014. 1- O-Tigloyl-1-O-deacetylnimbinol B Inhibits LPS-Stimulated inflammatory responses by suppressing NF-κB and JNK activation in microglia cells. *Journal of pharmacological sciences*, 125, 364-374.
28. Su, X., Shang, L., Xu, Q., Li, N., Chen, J., Zhang, L., Zhang, L. and Hua, Q., 2014. Prevalence and predictors of mild cognitive impairment in Xi'an: a communitybased study among the elders. *PloS one*, 9(1).
29. Grimholt, U., 2015. MHC and Evolution in Teleosts. *Biology*, 5 (6).
30. Hort, J., Vališ, M., Kuča, K. and Angelucci, F., 2019. Vascular cognitive impairment: information from animal models on the pathogenic mechanisms of cognitive deficits. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2405.
31. Taylor, CR., and Rudbeck, L., 2013. Immunohistochemical Staining Methods. *Dako Denmark : IHC Handbook*.
32. Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H. and Nakao, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(11), 5185-5190.
33. Tilghman, R.W., Cowan, C.R., Mih, J.D., Koryakina, Y., Gioeli, D., Slack-Davis, J.K., Blackman, B.R., Tschumperlin, D.J. and Parsons, J.T., 2010. Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype. *PloS one*, 5(9), 2905.
34. Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs Jr, D.R., Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V. and Zoeller, R.T., 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*, 33(3), 378-455.

35. Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S.M., Belzunces, L.P., Emond, C., Guerbet, M. and Rousselle, C., 2015. Non-monotonic dose-response Relationships and Endocrine Disruptors: A Qualitative Method of Assessment. *Environmental Health*, 14(1), 13.
36. Ma'arif, B., Agil, M. and Laswati, H., 2020. The Enhancement of Arg1 and Activated ER β Expression in Microglia HMC3 by Induction of 96% Ethanol Extract of *Marsilea crenata* Presl. Leaves. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30(5).
37. Modrall, J.G., Nanamori, M., Sadoshima, J., Barnhart, D.C., Stanley, J.C. and Neubig, R.R., 2001. ANG II Type 1 Receptor Downregulation Does Not Require Receptor Endocytosis or G Protein Coupling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281(3), 801-809.
38. Ismail, A. and Nawaz, Z., 2005. Nuclear Hormone Receptor Degradation and Gene Transcription: An Update. *IUBMB life*, 57(7), 483-490.
39. Gani, I. dan Amalia, S., 2015. Alat Analisis Data; Aplikasi Statistik untuk. Penentuan Bidang Ekonomi dan Sosial. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
40. Ososki, A.L. and Kennelly, E.J., 2003. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research*, 17(8), 845-869.
41. de Villiers, T.J., 2009. Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 23(1), 73-85.
42. Yang, T.S., Wang, S.Y., Yang, Y.C., Su, C.H., Lee, F.K., Chen, S.C., Tseng, C.Y., Jou, H.J., Huang, J.P. and Huang, K.E., 2012. Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 51(2), 229-235.
43. Abu-Taha, M., Rius, C., Hermenegildo, C., Noguera, I., Cerda-Nicolas, J.M., Issekutz, A.C., Jose, P.J., Cortijo, J., Morcillo, E.J. and Sanz, M.J., 2009. Menopause and ovariectomy cause a low grade of systemic inflammation that may be prevented by chronic treatment with low doses of estrogen or losartan. *The Journal of Immunology*, 183(2), 1393-1402.
44. Cui, J., Shen, Y. and Li, R., 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, 19(3), 197-209.