

Efek Ekstrak Daun *Marsilea crenata* Presl. pada Aktivitas Locomotor Ikan Zebra

The Effect of Marsilea crenata Presl. Leaves Extract on Zebrafish Locomotor Activity

Burhan Ma'arif^{1*}, Siti Maimunah¹, Faisal A. Muslikh², Nisfatul L. Saidah¹, Destiya A. P. Fihuda¹, Husnul Khotimah³, Mangestuti Agil⁴

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

²Mahasiswa Magister Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

³Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

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

*Korespondensi: burhan.maarif@farmasi.uin-malang.ac.id

Abstract

Background: The prevalence of neurodegenerative diseases increases every year and the majority is experienced by women who reach the menopause phase. This then reduces the quality of life of postmenopausal women. Neurodegenerative diseases in postmenopausal women are often caused by estrogen deficiency, so it is necessary to replace the hormone estrogen in maintaining homeostasis of the central nervous system, one of which is phytoestrogens. One of the plants containing phytoestrogens is semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) **Objective:** This study aimed to determine the effect of ethanol extract of *M. crenata* leaves on increasing locomotor activity of zebrafish. **Methods:** This study was conducted by induced rotenone as a disruptor of zebrafish locomotor activity, by measuring motility. The treatment was carried out by giving 96% ethanol extract of *M. crenata* leaves at a dose of 2.5; 5; 10; and 20 mg/mL to determine the effect of the extract on increasing locomotor activity of rotenone-induced zebrafish. Observations were made by looking at the quantity of zebrafish swimming every 5 minutes on day 0; 7; 14; 21; and 28. **Conclusion:** The administration of 96% ethanol extract of *M. crenata* leaves can increase locomotor activity which is known to increase zebrafish motility significantly at the optimum dose of 2.5 mg/mL in almost every group day. This proves that *M. crenata* leaf extract has the potential to prevent the progression of neurodegenerative diseases.

Keywords: Neurodegenerative, locomotor activity, zebrafish, semanggi, phytoestrogens

Abstrak

Pendahuluan: Prevalensi penyakit neurodegeneratif meningkat tiap tahunnya dan mayoritas dialami perempuan yang mencapai fase menopause. Hal tersebut kemudian mengurangi kualitas hidup perempuan menopause. Penyakit neurodegeneratif pada wanita menopause sering diakibatkan oleh defisiensi estrogen, sehingga perlu adanya pengganti hormon estrogen dalam menjaga homeostasis sistem saraf pusat, salah satunya fitoestrogen. Salah satu tanaman yang mengandung fitoestrogen adalah semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun *M. crenata* terhadap peningkatan aktivitas lokomotor ikan zebra. **Metode:** Penelitian ini dilakukan dengan induksi rotenon sebagai pengganggu aktivitas lokomotor ikan zebra, melalui pengukuran motilitas. Perlakuan dilakukan dengan dengan memberikan ekstrak etanol daun *M. crenata* pada dosis 2,5; 5; 10; dan 20 mg/mL untuk mengetahui pengaruh ekstrak terhadap peningkatan aktivitas lokomotor ikan zebra yang telah diinduksi rotenon. Pengamatan dilakukan dengan melihat kuantitas berenang ikan zebra setiap 5 menit pada hari ke 0; 7; 14; 21; dan 28. **Kesimpulan:** Pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dapat meningkatkan aktivitas lokomotor yang diketahui melalui peningkatan motilitas ikan zebra secara signifikan pada dosis optimum 2,5 mg/mL pada hampir tiap kelompok hari. Hal ini membuktikan ekstrak daun *M. crenata* berpotensi dalam mencegah progresifitas penyakit neurodegeneratif.

Kata kunci: Neurodegeneratif, aktivitas lokomotor, ikan zebra, semanggi, fitoestrogen

PENDAHULUAN

Prevalensi penyakit neurodegeneratif dengan karakteristik demensia telah meningkat di seluruh dunia dalam beberapa dekade terakhir. Pada tahun 2015 terdapat 46,8 juta orang di dunia memiliki penyakit neurodegeneratif, dan jumlah ini diperkirakan meningkat pada tahun 2050 menjadi 131,5 juta, yang sebagian besar pengidapnya ialah wanita (Prince *et al.*, 2015). Peningkatan prevalensi ini dikaitkan dengan peningkatan usia harapan hidup pada wanita, yaitu 70-80 tahun dan usia menopause relatif stabil pada 50-51 tahun. Akibatnya, masa menopause pada wanita menghabiskan lebih dari sepertiga hidupnya serta dapat menderita berbagai gangguan kesehatan akibat kekurangan estrogen, salah satunya adalah penyakit neurodegeneratif (Rachman, dkk., 2004).

Neurodegeneratif pada defisiensi estrogen disebabkan oleh penurunan aktivitas estrogen dalam mempertahankan homeostasis berbagai mekanisme sistem saraf pusat (SSP), yang dapat menyebabkan demensia akibat kematian sel saraf (Numakawa *et al.*, 2011; Fiocchetti *et al.*, 2012). Alzheimer dan Parkinson adalah contoh penyakit yang sering terjadi ketika perkembangan demensia tidak diperlambat (Engler-Chiurazzi *et al.*, 2017).

Beberapa jenis obat yang dapat digunakan untuk mengobati gangguan neurodegeneratif, yaitu Celecoxib, Ibuprofen, Minocycline, dan *hormone replacement therapy* (HRT) (Radtko *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2019). Dalam penggunaan jangka panjang, obat tersebut memiliki kemungkinan efek samping yang potensial, seperti mual, gastritis, abdominal pain, tekanan darah tinggi, sakit kepala, vertigo dan lain sebagainya (Wixey *et al.*, 2012; Mesa *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2019). Efek samping tersebut mendorong kebutuhan untuk melakukan penelitian selanjutnya terhadap sumber obat baru yang potensial dengan efek samping ringan, salah satunya adalah fitoestrogen (Ma'arif, 2020)

Fitoestrogen merupakan senyawa tumbuhan yang memiliki struktur mirip estrogen atau dapat menggantikan fungsi estrogen dalam mempertahankan homeostasis pada organ tubuh (Cui *et al.*, 2013; Ma'arif *et al.*, 2019), sehingga berpotensi sebagai pengobatan alternatif penyakit neurodegeneratif pascamenopause (Yang *et al.*, 2012). Fitoestrogen terdapat pada berbagai tanaman, salah satunya adalah semanggi (*Marsilea crenata* Presl.).

Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) adalah salah satu tanaman yang banyak digunakan di Surabaya, Jawa Timur sebagai makanan khas masyarakat setempat. Kandungan fitoestrogen daun Semanggi dan sifat neuroprotektifnya telah dibuktikan pada beberapa penelitian sebelumnya, baik secara *in silico* melalui hasil *metabolite profiling* terhadap protein 3OLS, serta secara *in vitro* melalui pengukuran beberapa *biomarker* pada sel mikroglia HMC3. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan di mana efek neuroprotektif dari daun Semanggi diuji secara *in vivo* pada fungsi lokomotor ikan zebra (*Danio rerio*), yang dapat merepresentasikan tingkat kesehatan SSP pada manusia. Penggunaan ikan zebra disebabkan adanya kesamaan gen yang mirip dengan gen manusia atau mamalia (Becker, 2012), sehingga digunakan secara representatif sebagai model uji untuk pengobatan neuroprotektif pada manusia.

Penelitian Semanggi bermanfaat dalam pengembangan berkelanjutan produk herbal neuroprotektif untuk meningkatkan kesehatan jemaah haji Indonesia serta dapat membantu melestarikan kekayaan keragaman budaya masyarakat Surabaya.

BAHAN DAN METODE

Tanaman dan bahan kimia

Daun *M. crenata* diperoleh pada bulan September 2019 di Desa Benowo, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia, dan diidentifikasi dengan kunci determinasi 1a-17b-18a-1 di UPT Materia Medica, Batu, Jawa Timur, Indonesia. Untuk menjaga warna hijaunya, daunnya dikeringkan dan dihaluskan dengan

hati-hati. Pelarut etanol 96% (Merck, Darmstadt, Jerman), *Rotenone* (Sigma-Aldrich, Missouri, Amerika Serikat), dimethyl sulfoxide (DMSO), dan tween 80 (Sigma-Aldrich, Missouri, Amerika Serikat).

Ikan Zebra

Ikan zebra jantan dewasa (6 bulan) diidentifikasi dan diperoleh dari Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, Indonesia. Sebelum perlakuan, ikan zebra diaklimatisasi dalam tangki terbuka ukuran 7L dan dipelihara sesuai dengan standart prosedur. Ikan diberi makan tiga kali sehari dengan *Tetra Bit and Color Tropical Flakes*, *Tetra Sales*, *Blacksburg*, Jerman, serta ditempatkan pada siklus terang-gelap 14:10. Suhu air dijaga antara 24 hingga 26,5 °C. Prosedur yang dilakukan tersebut sudah lolos uji etik oleh Komisi Etika Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor sertifikat etik 107-KEP-UB-2021.

Ekstraksi

Serbuk kering daun *M. crenata* diekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode *ultrasonic-assisted extraction* (UAE) dengan *ultrasonic bath* (Sonica 5300EP S3). Proses ini diulang untuk mengumpulkan semua filtrat, yang kemudian diuapkan dalam *rotary evaporator* (HEIDOLPH Hei-VAP G3) dan dikeringkan pada suhu 40 °C dalam oven (Memmert) untuk mendapatkan ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*.

Perawatan Rotenon dan *M. crenata*

Dalam penelitian ini, rotenon (Sigma 8875) sebanyak 5 µg/L digunakan untuk menghasilkan PD pada ikan zebra. Pada setiap kelompok, enam ekor ikan ditempatkan dalam satu tangki (P x L x T: 25cm x 14,5cm x 22cm), diberi makan tiga kali sehari, dan dilakukan penggantian media setiap 48 jam. Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol 96% *M. crenata* dalam berbagai dosis (2,5, 5, 10, dan 20 mg/mL), dan diberikan secara bersamaan dengan rotenon selama 28 hari. Untuk memastikan stabilitas suspensi, sampel disiapkan terlebih dahulu dengan 0,5% tween 80 dalam 0,5% DMSO.

Perhitungan Motilitas

Gangguan pada aktivitas lokomotor adalah karakteristik PD. Ikan memiliki kebutuhan bawaan untuk berenang bolak-balik melintasi tangki. Pengamatan sederhana digunakan untuk mengetahui aktivitas lokomotor *zebra fish* dewasa. Pergerakan ikan ditangkap dalam video berdurasi 5 menit, yang kemudian dimanipulasi menggunakan software *Adobe Photoshop* dan *Adobe Premiere* untuk membuat tiga garis vertikal yang digambar pada interval yang sama pada tangki, membaginya menjadi empat zona (panjang masing-masing zona adalah 5cm). Untuk mengetahui aktivitas lokomotor, dihitung jumlah jalur yang ditempuh oleh ikan zebra dewasa, dihitung selama 5 menit. Akibatnya, jarak keseluruhan perjalanan ikan zebra sebanding dengan jumlah garis yang dilintasi. Jumlah garis yang dilintasi oleh ikan zebra, dibagi dengan waktu, digunakan untuk menghitung aktivitas lokomotor, yang diberikan dalam jumlah garis yang disilangkan/5 menit. Aktivitas lokomotor dihitung dengan menggunakan jumlah garis yang dilintasi oleh ikan zebra dibagi dengan waktu, yang dinyatakan sebagai jumlah garis yang dilintasi/5 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Daun *M. crenata*

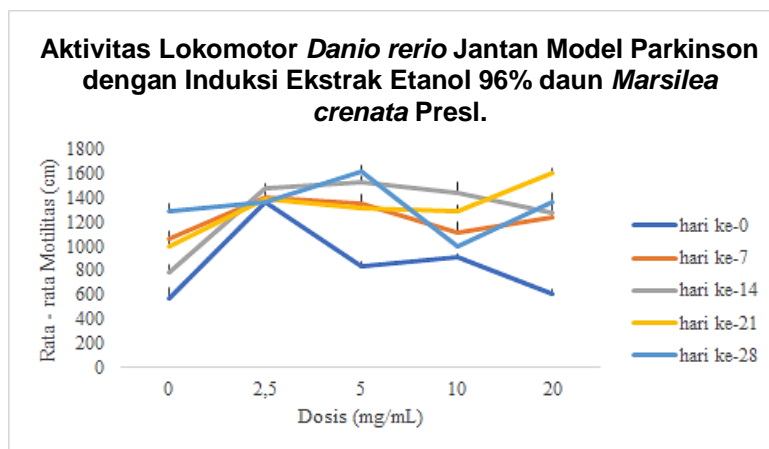
Sebanyak 39,4 g ekstrak etanol 96% diperoleh dari 900 g ekstraksi serbuk kering daun *M. crenata*, dengan rendemen 4,4%. Komposisi kimia *M. crenata* berperan penting dalam penggunaan medis dan *nutraceutical*, dan ini diduga karena komponen fitoestrogen yang aktif secara biologis. Penyelidikan sebelumnya telah menunjukkan bahwa menggunakan etanol 96% sebagai pelarut dapat mengekstrak komponen aktif dalam daun *M. crenata*. Kaempferol, kelompok isoflavon yang berfungsi sebagai bahan kimia mirip estrogen serta antioksidan dan antiinflamasi, adalah salah satu fitoestrogen yang teridentifikasi pada *M. crenata*.

Perhitungan Motilitas

Ikan zebra saat ini telah menjadi organisme model yang terkenal untuk mempelajari fungsi dan perkembangan genetik manusia. Karena ikan zebra adalah vertebrata, mereka mempunyai kedekatan hubungan yang lebih dengan manusia daripada organisme model lainnya. Banyak faktor yang menunjukkan bahwa ikan zebra adalah alat yang efektif untuk mempelajari penyakit manusia (Khotimah *et al.*, 2015). Rotenon yang merupakan salah satu jenis pestisida, digunakan sebagai inductor PD pada ikan zebra karena mekanismenya yang mirip komponen penyebab neuropatologis dan perilaku PD pada tikus (Subramaniam and Chesselet, 2013). Kekakuan atau hilangnya kapasitas untuk bergerak adalah gejala utama PD. Untuk mengetahui pengaruh rotenon terhadap aktivitas lokomotor, kami mengukur motilitas ikan zebra selama 5 menit. Penurunan motilitas

ikan zebra mungkin disebabkan oleh penurunan kecepatan konduksi saraf motorik. Hal ini didukung oleh pembuktian hubungan antara kerusakan dopaminergik dan degenerasi saraf motorik perifer pada hewan coba yang diinduksi rotenon (Binienda *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini pemberian rotenon tidak menunjukkan adanya penurunan aktivitas lokomotor pada ikan zebra tiap minggunya, kondisi ini dimungkinkan karena adanya pengaruh terhadap suhu dan pencahayaan. Rotenon juga sangat sensitif terhadap cahaya dan oksigen, sehingga akan terdegradasi menjadi rotenolon yang kurang aktif dibandingkan rotenon. Laju dekomposisi rotenon tergantung pada beberapa faktor seperti suhu, pH, sinar matahari, kedalaman, dosis dan keberadaan puing puing organik (Ling, 2003; Radad *et al.*, 2019).



Gambar 1. Aktivitas lokomotor ikan zebra jantan model parkinson dengan induksi ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*

Hasil penelitian ditunjukkan pada **Gambar 1**, dimana pemberian sampel dosis 2,5 mg/mL menunjukkan aktivitas lokomotor yang berbeda signifikan terhadap kontrol negatif (K. Rotenon) pada hari ke 0, 7, 14, dan 21, dengan nilai signifikansi masing-masing sebesar 0.000. Selanjutnya, pemberian sampel dosis 5 mg/mL menunjukkan aktivitas lokomotor yang berbeda signifikan terhadap kontrol negatif pada semua hari, dengan nilai signifikansi secara berturut-turut sebesar 0.000, 0.001,

0.000, 0.000, 0.000. Kemudian pemberian sampel dosis 10 mg/mL menunjukkan aktivitas lokomotor yang berbeda signifikan terhadap kontrol negatif pada hari ke 14, 21, dan 28, dengan nilai signifikansi masing-masing sebesar 0.000. Terakhir, pemberian sampel dosis 20 mg/mL menunjukkan aktivitas lokomotor yang berbeda signifikan terhadap kontrol negatif pada hari ke 7, 14, dan 21, dengan nilai signifikansi secara berturut-turut sebesar 0.019, 0.000, dan 0.000.

Tabel 1. Motilitas ikan zebra untuk setiap kelompok dosis

Hari	Rata-rata motilitas ikan zebra untuk setiap kelompok dosis (cm dalam 5 menit)				
	K. Rotenon	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL
0	576.33 ± 78.386	1364 ± 34.699*	832.33 ± 36.896*	909 ± 29.547	614.33 ± 29.297
7	1056.3 ± 65.248	1403 ± 86.029*	1347.7 ± 83.787*	1118.3 ± 81.525	1235.7 ± 73.242*
14	787.33 ± 60.682	1475.3 ± 35.838*	1527 ± 57.42*	1438.7 ± 87.535*	1282 ± 66.836*
21	999.33 ± 54.592	1396.7 ± 40.87*	1318.7 ± 97.295*	1292.3 ± 53.715*	1609 ± 40.361*
28	1284 ± 74.706	1365.3 ± 23.544	1620 ± 52.915*	1001 ± 3.6056*	1359.7 ± 83.859

*Setiap nilai dinyatakan sebagai mean ± SD. Perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif (0 mg / mL) pada $p < 0,05$.

Hasil penelitian juga dapat dilihat dari **Tabel 1** yang menunjukkan bahwa pada hari ke-7 terjadi peningkatan laju motilitas yang paling signifikan pada kelompok perlakuan dosis 2,5 mg/mL dibandingkan dosis lain dengan nilai sig 0.000 ($p < 0,05$). Sedangkan pada hari ke-14 menunjukkan bahwa dosis yang meningkatkan motilitas ikan paling tinggi adalah dosis 5 mg/mL dibandingkan dosis lain dengan nilai sig 0.000 ($p < 0,05$). Selanjutnya pada pada hari ke-21 menunjukkan bahwa dosis yang meningkatkan motilitas ikan paling tinggi adalah dosis 20 mg/mL dibandingkan dosis lain dengan nilai sig 0.000 ($p < 0,05$). Pada hari ke-28 menunjukkan bahwa dosis yang meningkatkan motilitas ikan paling tinggi adalah dosis 5 mg/mL dibandingkan dosis lain dengan nilai sig 0.000 ($p < 0,05$).

Pemberian ekstrak etanol 96% daun semanggi dapat meningkatkan motilitas ikan zebra secara signifikan pada dosis optimum 2,5 mg/mL. Namun, peningkatan dosis pengobatan tidak selalu disertai dengan peningkatan motilitas ikan, begitu juga dengan pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* disetiap minggunya. Hal ini terjadi karena adanya efek *non-monotonic dose-response* (NMDR) pada respon ikan zebra dengan pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*. Nilai kemiringan yang bervariasi menunjukkan karakteristik NMDR di beberapa titik dalam kisaran dosis yang diberikan. NMDR sering terjadi pada

penelitian dengan perlakuan hormon atau sampel yang digunakan sebagai pengganti hormon, dalam hal ini senyawa fitoestrogen dalam ekstrak etanol 96% daun *M. crenata*. Perbedaan tingkat afinitas antara hormon atau sampel sulih hormon dengan target akan menyebabkan kesulitan dalam memprediksi respon yang akan muncul dengan meningkatnya dosis (Vandenberg *et al.*, 2012). Respon NMDR dari fitoestrogen dapat terjadi karena perbedaan dalam afinitas dan selektivitas reseptor. Pada dosis rendah, fitoestrogen akan mengikat reseptor estrogen (ER) dengan afinitas tinggi, menghasilkan respons aktivitas yang masif. Namun, dengan dosis yang lebih tinggi, fitoestrogen berikatan dengan reseptor lain, yang juga ada di ikan zebra, yang menyebabkan penurunan respons aktivitas akibat efek antagonis antara dua reseptor yang berbeda (Vandenberg *et al.*, 2012)

Fitoestrogen merupakan senyawa dari tumbuhan yang memiliki struktur dan fungsi menyerupai estrogen, utamanya 17β -estradiol. Fitoestrogen dapat menggantikan fungsi estrogen dalam menjaga homeostasis tubuh, memiliki tingkat keamanan sekaligus aktivitas yang lebih baik daripada HRT. Fitoestrogen dapat memberikan efek estrogenik baik melalui jalur ikatan dengan ER (ER-dependent), maupun tidak (ER-independent) (Cui *et al.*, 2013). Senyawa fitoestrogen yang terkandung dalam daun Semanggi yang bersifat sebagai anti

neuroinflamasi (salah satu mekanisme neuroprotektif) dan antioksidan melalui jalur ER-dependent dan ER-independent. Adanya ikatan antara fitoestrogen dan ER pada jalur ER-dependent, dapat mengaktifasi ER dalam nukleus dan menghambat aktivasi faktor transkripsi proses inflamasi, yang selain menyebabkan penurunan produksi sitokin inflamasi seperti interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide (NO), dan ROS (Au *et al.*, 2016; Engler-Chiurazzi *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol 96% daun *M. crenata* dapat meningkatkan aktivitas lokomotor yang diketahui melalui peningkatan motilitas ikan zebra secara signifikan pada dosis optimum 2,5 mg/mL pada hampir tiap kelompok hari. Hal ini membuktikan ekstrak daun *M. crenata* berpotensi dalam mencegah progresifitas penyakit neurodegeneratif.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dapat terlaksana dengan adanya dana bantuan penelitian dan publikasi ilmiah dosen dan mahasiswa tahun anggaran 2021, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

DAFTAR PUSTAKA

- Au, A., Feher, A., McPhee, L., Jessa, A., Oh, S. and Einstein, G., 2016, Estrogens, inflammation and cognition, *Frontiers in neuroendocrinology*. **40** : 87-100
- Barros-Becker, F., Romero, J., Pulgar, A., & Feijóo, C. G., 2012, Persistent oxytetracycline exposure induces an inflammatory process that improves regenerative capacity in zebrafish larvae, *PLoS one*. **7**(5) : e36827.
- Becker, J. R., Robinson, T. Y., Sachidanandan, C., Kelly, A. E., Coy, S., Peterson, R. T., & MacRae, C. A. 2012, In vivo natriuretic peptide reporter assay identifies chemical modifiers of hypertrophic cardiomyopathy signaling, *Cardiovascular research*. **93**(3) : 463-470.
- Binienda ZK, Sarkar S, Mohammed-Saeed L, Gough B, Beaudoin MA, Ali SF, et al. 2013, Chronic exposure to rotenone, a dopaminergic toxin, results in peripheral neuropathy associated with dopaminergic damage, *Neurosci Lett*. **541** : 233-7
- Constantine, G. D., & Pickar, J. H. 2003, Estrogens in postmenopausal women: recent insights, *Current opinion in pharmacology*. **3**(6) : 626-634.
- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. 2013, Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain, *Trends in molecular medicine*. **19**(3) : 197-209.
- Dong, D., Xie, J., & Wang, J. 2019, Neuroprotective effects of brain-gut peptides: a potential therapy for Parkinson's disease, *Neuroscience bulletin*. **35**(6) :1085-1096.
- Engler-Chiurazzi, E. B., Brown, C. M., Povroznik, J. M., & Simpkins, J. W. 2017, Estrogens as neuroprotectants: estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury, *Progress in neurobiology*. **157**, 188-211.
- Fiocchetti, M., Ascenzi, P., & Marino, M. 2012, Neuroprotective effects of 17 β -estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals, *Frontiers in physiology*. **3** : 73.
- Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A., & Gálvez, J. 2013, Minocycline: far beyond an antibiotic, *British journal of pharmacology*. **169**(2) : 337-352.
- Khotimah, H., Ali, M., Sumitro, S. B., & Widodo, M. A. 2015, Decreasing α -synuclein aggregation by methanolic extract of Centella asiatica in zebrafish Parkinson's model, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **5**(11) : 948-954.
- Ling, N. 2003, Rotenone—a review of its toxicity and use for fisheries management, *Science for conservation*. **211** : 1-40.
- Ma'arif, Burhan., 2020, Aktivitas Antineuroinflamasi Ekstrak dan Fraksidari Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) Terhadap sel Mikroglia HMC3 *In Vitro*, Disertasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.
- Ma'arif, B., Aditama, A., Mutiah, R., Bhagawan, W.S., Amiruddin, R., Rukiana. 2019, Profil metabolit

- berbagai ekstrak daun chrysophyllum cainito L. menggunakan UPLC-QTOF-MS/MS, *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*. **12**(1) : 10-24.
- Mesa, N.G., Zarzuelo, A. and Gálvez, J., 2013, Review minocycline: far beyond and antibiotic, *British Journal of Pharmacology*. **169** : 337–352
- Numakawa, T., Matsumoto, T., Numakawa, Y., Richards, M., Yamawaki, S., & Kunugi, H. . 2011, Protective action of neurotrophic factors and estrogen against oxidative stress-mediated neurodegeneration. *Journal of Toxicology*. .
- Prince, M. J., Wimo, A., Guerchet, M. M., Ali, G. C., Wu, Y. T., & Prina, M. 2015, World Alzheimer Report 2015-The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends.
- Rachman, I.A., Soewondo, P., Setiati, S., Kusumawijaya, K., Baziad, A., Witjaksono, J., Sukarya, W.S., Silvia., 2004, *Terapi Sulih Hormon pada Wanita Perimenopause*, HTA Indonesia.
- Radad, K., Al-Shraim, M., Al-Emam, A., Wang, F., Kranner, B., Rausch, W. D., & Moldzio, R. 2019, Rotenone: From modelling to implication in Parkinson's disease, *Folia neuropathologica*. **57**(4) : 317-326.
- Radtke, F. A., Chapman, G., Hall, J., & Syed, Y. A. 2017, Modulating neuroinflammation to treat neuropsychiatric disorders. *BioMed research international*, **2017**.
- Subramaniam, S. R., & Chesselet, M. F. 2013, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease, *Progress in neurobiology*. **106** : 17-32.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr. DR, Lee DH, et al. 2012, Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses, *Endocr Rev*. **33** : 378–455.
- Wixey, J.A., Reinebrant, H.E. and Buller, K.M., 2012, Post-insult ibuprofen treatment attenuates damage to the serotonergic system after hypoxia-ischemia in the immature rat brain, *J Neuropathol Exp Neurol*. **71**(12) : 1137-1148.
- 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
- Zhang, L., Chen, Y., Jiang, Q., Song, W., & Zhang, L. 2019, Therapeutic potential of selective histone deacetylase 3 inhibition, *European Journal of Medicinal Chemistry*. **162** : 534-542.
- Zheng, X., Yue, P., Liu, L., Tang, C., Ma, F., Zhang, Y., Wang, C., Duan, H., Zhou, K., Hua, Y., Wu, G. and Li, Y., 2019, Efficacy between low and high dose aspirin for the initial treatment of kawasaki disease: Current evidence based on a metaanalysis, *PLoS ONE*. **14**(5).