

## Efek Neuroprotektif Fraksi Air Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) secara In Vitro

### Neuroprotective Effects of Water Fraction of *Marsilea crenata* Presl. Leaves with In Vitro Analysis

Burhan Ma'arif<sup>1\*</sup>, Menara Muslim<sup>1</sup>, Anisa Eka Riyanti<sup>1</sup>, Abdul Malik Guhir<sup>1</sup>, Dilla Amalia<sup>1</sup>, Nisfatul Lailatus Saidah<sup>1</sup>, Wirda Anggraini<sup>1</sup>, Ria Ramadhani Dwi Atmaja<sup>1</sup>, Hening Laswati<sup>2</sup>, Mangestuti Agil<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, 65151

<sup>2</sup> Departemen Ilmu Kedokteran Fisik dan Rehabilitasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132

<sup>3</sup> Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115

Received: 12/12/2020 Accepted: 8/1/2021 Published: 30/3/2021

\*Korespondensi: [burhan.maarif@farmasi-uin.malang.ac.id](mailto:burhan.maarif@farmasi-uin.malang.ac.id)

#### Abstract

**Background:** Estrogen deficiency can trigger several diseases, one of which is neurodegenerative. Neurodegenerative begins with neuroinflammation, which triggers the activation of microglia cells resulting in a pro-inflammatory activity. Potential and relatively safe therapy to use to overcome it is by using phytoestrogen compounds. *Marsilea crenata* Presl. is a plant that contains phytoestrogens.

**Objective:** The purpose of this study was to analyze the neuroprotective effect of the water fraction of *Marsilea crenata* Presl. leaves which was shown by inhibition of neuroinflammation and marked by increased levels of MHC II against HMC3 microglia cells. **Methods:** IFN- $\gamma$  is induced into HMC3 microglia cells for 24 hours to cause inflammatory conditions. *Marsilea crenata* Presl. leaves water fraction was given at a dose of 62,5; 125; and 250  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Analysis of the neuroprotective effect of HMC3 microglia cells using the ICC method with the aid of the CLSM instrument. **Results:** The results of this study indicate that the water fraction of *Marsilea crenata* Presl. leaves can reduce MHC II expression at concentrations of 125 and 250  $\mu\text{g} / \text{ml}$  with values of 465,748 and 460,884 AU at  $p < 0,005$ . **Conclusion:** This study concludes that the water fraction of *Marsilea crenata* Presl. has neuroprotective activity shown at doses of 125 and 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  which can reduce MHC II expression in HMC3 microglia cells induced by IFN- $\gamma$ . The ED<sub>50</sub> value which has a neuroprotective effect is at a dose of 0,582  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Keywords:** neuroprotective, *Marsilea crenata* Presl., MHC II, HMC3 Microglia Cells

#### Abstrak

**Pendahuluan:** Defisiensi estrogen dapat menimbulkan beberapa penyakit, salah satunya neurodegeneratif. Neurodegeneratif diawali dengan neuroinflamasi yang memicu aktifnya sel mikroglia sehingga berakibat pada aktivitas pro-inflamasi. Terapi yang potensial dan relatif aman digunakan untuk mengatasinya yaitu dengan menggunakan senyawa fitoestrogen. *Marsilea crenata* Presl. merupakan salah satu tanaman yang mengandung fitoestrogen. **Tujuan:** Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis efek neuroprotektif dari fraksi air daun *Marsilea crenata* Presl. yang ditunjukkan dengan penghambatan neuroinflamasi dan ditandai dengan meningkatnya kadar MHC II terhadap sel mikroglia HMC3. **Metode:** IFN- $\gamma$  diinduksikan ke dalam sel mikroglia HMC3 selama 24 jam untuk menimbulkan kondisi inflamasi. Fraksi air daun *Marsilea crenata* Presl. diberikan dengan dosis 62,5; 125; dan 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Analisis efek neuroprotektif sel mikroglia HMC3 menggunakan metode ICC dengan bantuan instrumen CLSM. **Hasil:** Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi air daun *Marsilea crenata* Presl. dapat menurunkan ekspresi MHC II pada konsentrasi 125 dan 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dengan nilai 465,748 dan 460,884 AU pada  $p < 0,005$ . **Kesimpulan:** Kesimpulan dari penelitian ini yaitu fraksi air daun *Marsilea crenata* Presl. memiliki aktivitas neuroprotektif ditunjukkan dengan dosis 125 dan 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  yang dapat menurunkan ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC3 yang diinduksi oleh IFN- $\gamma$ . Nilai ED<sub>50</sub> yang mempunyai efek neuroprotektif yaitu pada dosis 0,582  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Kata kunci:** neuroprotektif, *Marsilea crenata* Presl., MHC II, sel mikroglia HMC 3.

## PENDAHULUAN

Wanita pascamenopause akan mengalami kondisi defisiensi estrogen, yaitu kekurangan hormon estrogen dalam tubuhnya (Sherwood, 2016). Kondisi defisiensi estrogen dapat memicu beberapa penyakit, salah satunya neurodegeneratif (Rettberg *et al.*, 2014). Neurodegeneratif merupakan kondisi patologis yang ditandai dengan berkurangnya kemampuan kognitif dan memori karena hilangnya kemampuan fisiologis sel pada sistem saraf (Kovacs, 2014). Neurodegeneratif bermula dari kondisi inflamasi di sistem saraf pusat yang disebut neuroinflamasi, sehingga memicu aktifnya sel mikroglia yang berujung pada aktivitas pro-inflamasi, akibatnya banyak sel neuron mengalami apoptosis dan jumlahnya semakin berkurang (Chen, *et al.*, 2016).

Gangguan kognitif yang terjadi pada otak seperti neuroinflamasi akibat defisiensi estrogen dapat diatasi dengan penggunaan terapi sulih hormon (TSH) (Chamniansawat *et al.*, 2014). Namun, penggunaan TSH dalam jangka panjang dapat menimbulkan efek samping yang besar seperti *coronary event*, *venous thromboembolism*, stroke, kanker payudara, dan demensia. Oleh karena itu diperlukan penggantian terapi yang dapat dilihat dari nilai keamanan dengan manfaat yang relatif sama (Lee *et al.*, 2013; Sirotkin dan Harrath, 2014; Agil *et al.*, 2019).

Alternatif terapi yang potensial dan relatif aman dapat berasal dari tumbuh-tumbuhan. Tumbuhan menyimpan unsur makro maupun mikro yang dibutuhkan oleh manusia (Trisunuwati, 2017). Fitoestrogen sendiri merupakan kelompok senyawa yang memiliki fungsi atau struktur mirip estrogen, sehingga dinilai dapat menggantikan fungsi estrogen dalam tubuh (Yang *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2013). Salah satu tanaman yang memiliki kandungan senyawa fitoestrogen yaitu *Marsilea crenata* Presl. atau dikenal dengan semanggi (Michel *et al.*, 2013).

Semanggi merupakan tanaman khas yang banyak tumbuh di Jawa Timur, Indonesia. Daunnya banyak digunakan masyarakat sebagai bahan makanan, seperti digunakan sebagai lalapan (Akbar *et al.*, 2014; Nurjanah, dkk., 2012). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun *Marsilea crenata* Presl. mengandung zat-zat yang menyerupai estrogen, baik berupa struktur, aktivitas, maupun afinitasnya (Laswati, 2011; Ma'arif, 2018; Adityara, 2017; Ma'arif *et al.*, 2016). Kelompok senyawa fitoestrogen banyak diketahui berasal dari golongan flavonoid (Ganai and Farooqi, 2015). Penggunaan pelarut air diharapkan dapat menarik senyawa flavonoid yang bersifat polar dalam daun *Marsilea crenata* Presl.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek neuroprotektif dari fraksi air daun *Marsilea crenata* Presl. yang ditunjukkan dengan terjadinya penghambatan neuroinflamasi dan ditandai dengan meningkatnya kadar *major histocompatibility complex II* (MHC II) terhadap sel mikroglia *human microglia clone 3* (HMC3). Kondisi defisiensi estrogen dilakukan dengan induksi IFN- $\gamma$  pada sel mikroglia HMC3 (Cherry *et al.*, 2014). Marker yang diamati yaitu ekspresi MHC II karena marker tersebut merupakan penanda terjadinya neuroinflamasi yang diakibatkan peningkatan jumlah mikroglia teraktivasi dan merupakan marker yang muncul saat makrofag diinduksi oleh *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ) (Klaassen and Watkins, 2015; Paracha *et al.*, 2015; Matt and Johnson, 2016; Chamniansawat and Chongtammakun, 2015). Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan metode *immunocytochemistry* (ICC) untuk mengetahui potensi aktivitas daun *Marsilea crenata* Presl. sebagai agen neuroprotektif pada sel mikroglia HMC3 dengan pengamatan reaksi antigen dan antibodi yang dianalisis menggunakan mikroskop berdasarkan pembacaan label atau biomarker spesifik.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Daun *Marsilea crenata* Presl. dipanen dari Benowo, Surabaya, Indonesia. Etanol 96%, tween 80, alkohol 70%, *n*-heksan, etil asetat, *n*-butanol, dan aquadest dibeli dari Merck. *Phosphate buffer saline* (PBS), *fetal bovine serum* (FBS), *eagle's minimum essential medium* (EMEM), *dimethyl sulfoxide* (DMSO), Anti-Rabbit FITC, paraformaldehida (PFA), dan *bovine serum albumin* (BSA) dibeli dari Sigma-Aldrich. Anti-Rabbit MHC II, dan Triton X-100. Sel yang digunakan adalah sel mikroglia dari *american type culture collection* (ATCC), USA, yang merupakan sel mikroglia dari manusia.

### Alat

Erlenmeyer 500 ml, gelas ukur 500 ml, batang pengaduk, corong pisah, kertas saring, spatula, pipet ukur, cawan porselen, *conical tube* 15 ml, *conical tube* 50 ml, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, spuit 10 ml, *flask culture* 25 cm<sup>2</sup>, mikropipet 1000 µl, mikrofilter 0,22 µm, *ultrasonic cleaner* (Soltec Sonica 5300 EP S3), *rotary evaporator* (Heidolph Hei VAP ML/G3), oven (Mettler UN 55), *biosafety cabinet* (Thermo Scientific Hera Safe KS Class II), incubator (Thermo Scientific Hera Cell 150i CO<sub>2</sub>), mikroskop *inverted* (Olympus tipe CX23), *confocal laser scanning microscopy* (CLSM) fluoview Olympus tipe FV1000, waterbath (Thermo Scientific Aquabath 18022AQ), *24-well microplate*, centrifuge (LW C5), dan coverslip.

### Metode

#### Kultur sel

Sel mikroglia HMC3 dikultur didalam flask 25 cm<sup>2</sup>, yang mengandung 10% FBS, 1% penstrep, medium komplet EMEM ± 5 ml. Kemudian dimasukan kedalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37 °C. Sel diinkubasi ± 7 hari.

#### Ekstraksi dan fraksinasi

Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode *ultrasonic asisted extraction* (UAE). Ditimbang 30 gram serbuk simplisia daun *Marsilea crenata* Presl

budidaya, ditambahkan 500 ml etanol 96%, diekstraksi dengan *ultrasonic bath* soltec selama 3x2 menit, kemudian disaring dan filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* Heidolph G3. Ekstrak etanol 96% yang sudah kental disuspensikan dengan aquadest 700 ml, dimasukkan dalam corong pisah, ditambahkan pelarut *n*-heksana 700 ml, kemudian dikocok dan didiamkan hingga terpisah 2 fase. Fase *n*-heksana diambil, kemudian dilanjutkan fraksinasi fase air dengan pelarut etil asetat 700 ml. Fase etil asetat dipisahkan dan dilanjutkan fraksinasi fase air dengan *n*-butanol 700 ml hingga terbentuk 2 fase yang terpisah. Fase air diambil dan diuapkan dengan *rotary evaporator* Heidolph G3.

#### Uji Sampel

IFN-γ diinduksikan pada sel yang telah dikultur dalam *microplate* 24 *well* dan mencapai konfluensi sebanyak 80%. Setelah diinduksi dengan IFN-γ selama 24 jam, sel dibilas dengan PBS lalu diberi perlakuan menggunakan sampel. Sampel disiapkan dengan menimbang fraksi air 50 mg dan dicampur dengan 0,5% tween 80 dan DMSO 0,5% yang kemudian disuspensikan pada suhu kamar untuk menghasilkan sampel 5000 µg/ml. Setiap sampel disaring menggunakan 0,22 µl Millipore. Fraksi air 5000 µg/ml diencerkan untuk menghasilkan konsentrasi akhir 62,5; 125; 250 µg/ml. Larutan sampel kemudian ditambahkan ke dalam *microplates* 24-*well* yang mengandung sel mikroglia HMC3 selama 48 jam. Setelah itu medium komplet ditambahkan pada *microplates* 24-*well*, sel kemudian difiksasi dengan PFA 4% selama 15 menit. Selanjutnya, dibilas dengan PBS selama 5 menit, dibuang PBS, ditambahkan *blocking buffer* 300µl dan ditunggu 20 menit. Setelah itu dibilas kembali dengan PBS, ditambahkan antibodi primer (anti-rabbit MHC II) 300 µl/*well* dan ditunggu 1 jam. Selanjutnya dibilas dengan PBS 3x5 menit, ditambahkan antibodi sekunder (anti-rabbit FITC) 300 µl/*well*, ditunggu selama 45

menit dengan dilapisi aluminium foil. Kemudian, dibilas dengan PBS 3x5 menit dan divisualisasikan MHC II dengan CLSM dan software yang digunakan Olympus Fluoview Ver.4.2a. pada panjang gelombang 488 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Estrogen merupakan hormon primer yang dimiliki wanita dan berperan penting terhadap proses inflamasi, khususnya neuroinflamasi. Hal ini dikarenakan estrogen merupakan faktor transkripsi yang mampu berinteraksi dengan faktor transkripsi lainnya. Faktor transkripsi yang dapat berinteraksi dan dipengaruhi oleh estrogen adalah *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Nf- $\kappa$ B) (Villa *et al.*, 2016).

Kondisi defisiensi estrogen akan menyebabkan berbagai masalah kesehatan, salah satunya yaitu ketidakseimbangan aktivitas otak (Tang dan Lee, 2015; Varshney dan Nalvarte, 2017). Hal ini disebabkan oleh *estrogen receptor* (ER) yang tidak berikatan dengan hormon estrogen dalam tubuh sehingga menyebabkan penurunan jumlah ER yang teraktivasi. Penurunan jumlah ER teraktivasi dalam sistem saraf pusat menghasilkan peningkatan aktivitas NF- $\kappa$ B, yang dapat mempengaruhi transkripsi protein, salah satunya di sel HMC3 (Villa *et al.*, 2016). NF- $\kappa$ B merupakan faktor transkripsi yang bertanggung jawab untuk sistem kekebalan tubuh dan respons inflamasi (Kovacs, 2014).

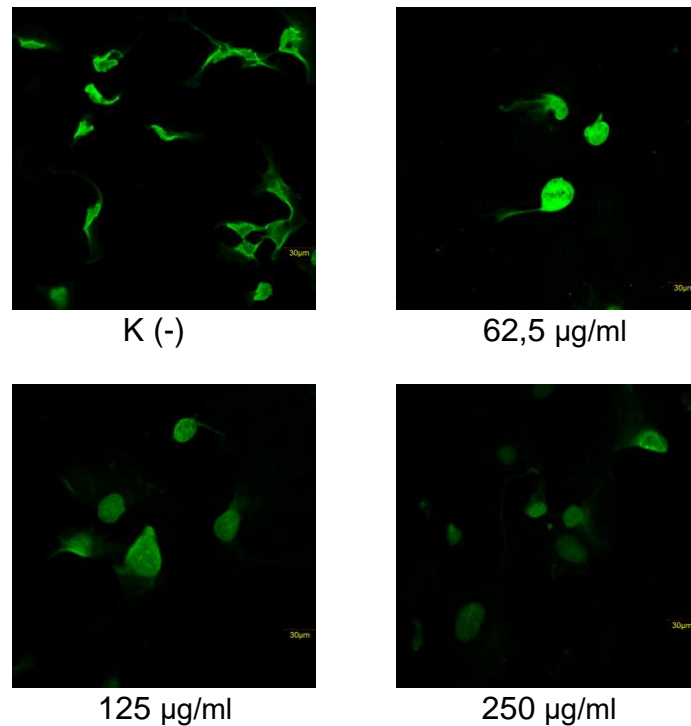
Kondisi defisiensi estrogen dalam penelitian ini dilakukan dengan menginduksi IFN- $\gamma$  pada sel. IFN- $\gamma$  merupakan sitokin pro-inflamasi yang mampu mengaktivasi makrofag dan menginduksi keluarnya marker MHC I maupun MHC II (Klaassen and Watkins, 2015). IFN- $\gamma$  mengaktifkan sel mikroglia HMC3 yang secara patofisiologis akan memasuki mikroglia melalui *Toll Like Receptor 4* (TLR4) dan mengaktifkan NF- $\kappa$ B untuk mendekati inti sel mikroglia karena terjadi perubahan isomer pada senyawa

protein dari monomer menjadi oligomer, kemudian mempengaruhi sintesis protein sel (Tang dan Lee, 2015; Villa *et al.*, 2016). Sel mikroglia HMC3 yang aktif bersifat pro-inflamasi (Cherry *et al.*, 2014; Mizuno, 2015).

Metode pewarnaan yang digunakan yaitu metode ICC dan divisualisasikan dengan instrumen CLSM. ICC merupakan metode identifikasi aktivitas atau reaksi molekuler yang memanfaatkan reaksi antigen dengan antibodi yang dianalisis dengan mikroskop dengan pembacaan label atau biomarker spesifik (Brooks, 2012)

Reaksi imunologis ini mampu memvisualisasi biomarker untuk pengamatan aktivitas dalam bentuk fluoresensi. Protein yang dijadikan biomarker dalam penelitian ini adalah MHC II. Hal ini dikarenakan pada mikroglia lebih dominan mengeluarkan MHC II saat terjadi inflamasi. Hasil yang diperoleh dari CLSM berupa gambar sel yang sedang berpendar berwarna hijau. Pendaran pada objek gambar tersebut lalu dianalisis secara kualitatif dengan software Olympus Fluoview Ver.4.2a. Hasil tersebut ditampilkan pada Gambar 1 dan Gambar 2.

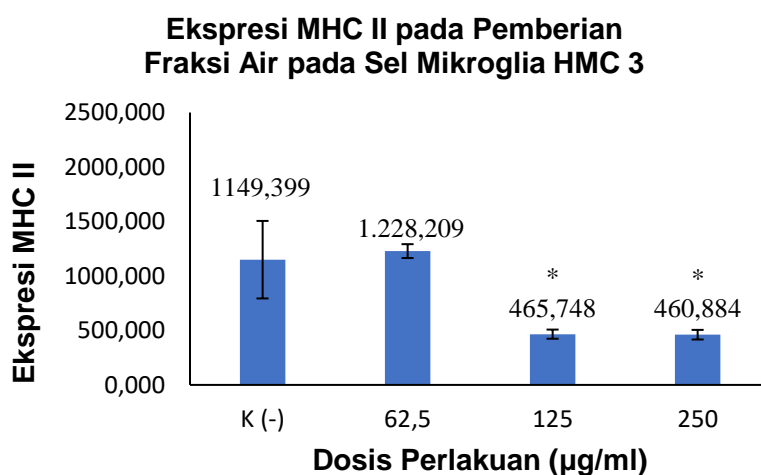
Gambar 1 merupakan hasil dari visualisasi menggunakan instrumen CLSM. Hasil pendar tersebut memperlihatkan ekspresi MHC II dalam bentuk gambar dan angka dengan satuan *Arbitrary Unit* (AU). Gambar 2 merupakan hasil perbandingan ekspresi MHC II pada dosis 62,5; 125; dan 250  $\mu$ g/ml dengan kontrol negatif. Pada dosis 125 dan 250  $\mu$ g/ml menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kontrol negatif pada  $p < 0,005$ . Nilai ekspresi MHC II pada dosis 62,5  $\mu$ g/ml lebih tinggi daripada kontrol negatif, sedangkan dosis 125 dan 250  $\mu$ g/ml lebih rendah daripada kontrol negatif. Hasil yang diperoleh tidak linear, karena terjadi peningkatan MHC II pada dosis 62,5  $\mu$ g/ml. Hal ini karena pengaruh *non monotonic dose response* (NMDR) yang terjadi karena selektifitas reseptor.



**Gambar 1.** Intensitas Fluoresensi MHC II pada Sel Mikroglia HMC3

Secara matematik NMDR merupakan perubahan arah slope (positif atau negatif) antara aktivitas dengan pemberian obat yang linear (Lagarde, *et al.*, 2015). NMDR dapat terjadi pada sel, jaringan, hewan, dan populasi manusia karena pemberian nutrisi, vitamin, hormon, maupun bahan kimia yang berinteraksi dengan reseptor termasuk

hormon yang bersifat mengganggu. Sehingga hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan hipotesis awal. Hal tersebut dapat dilihat pada pemberian fraksi air *Marsilea crenata* Presl. pada dosis 62,5 µg/ml yang memberikan intensitas yang melampaui kontrol negatif. Salah satu penyebabnya adalah selektivitas reseptor (Vandenberg, *et al.*, 2012).



**Gambar 2.** Ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC3 setelah pemberian fraksi air daun *Marsilea crenata* Presl. Setiap nilai dinyatakan sebagai rata-rata ± SD. \*Berbeda signifikan dengan kontrol negatif pada  $p < 0,005$ .

Analisis ED<sub>50</sub> dilakukan dengan Regresi Probit. Nilai ED<sub>50</sub> menunjukkan nilai dosis efektif yang dapat diberikan. Hasil nilai uji probabilitas diperoleh nilai ED<sub>50</sub> sebesar 0,582 µg/ml, sehingga dengan dosis 0,582 µg/ml dapat menyebabkan 50% efek neuroprotektif dari fraksi air *Marsilea crenata* Presl. pada sel mikroglia HMC3 yang diinduksi IFN-γ. Nilai signifikansi yang bermakna dari keseluruhan kelompok uji menunjukkan bahwa kandungan senyawa fitoestrogen yang diduga terdapat pada fraksi air daun *Marsilea crenata* Presl. memiliki aktivitas farmakologi dalam neuroprotektif.

Nf-κB yang berada di sitoplasma merupakan Nf-κB yang belum aktif dan memerlukan stimulus berupa sitokin pro-inflamasi, salah satunya IFN-γ. Adanya IFN-γ menyebabkan fosforilasi pada ikatan heterodimer Nf-κB. Hal ini dapat menyebabkan Nf-κB melepas ikatan dengan regulatornya, yakni IκB. Nf-κB yang telah dalam keadaan tunggal akan melakukan translokasi ke nukleus. Bersama dengan ko-aktivator menuju target gene di rantai DNA tertentu untuk mengaktivasi mikroglia. Aktifnya makrofag dapat diketahui dari terekspresinya beberapa biomarker, salah satunya yaitu MHC II yang spesifik pada neuron (Green, *et al.*, 2017). Estrogen yang terdapat di otak dapat berikatan dengan ER sehingga mampu meregulasi proses neuroinflamasi dalam jumlah yang tepat. Namun, pada wanita pasca menopause yang telah kehilangan kemampuan memproduksi estrogen secara endogen kehilangan regulator yang menyebabkan neurodegeneratif. Fitoestrogen dalam *Marsilea crenata* Presl. memiliki afinitas dengan ERβ. Aktivitas yang ditimbulkan sama dengan aktivitas estrogen. Senyawa fitoestrogen berikatan dengan ERβ di membran atau sitoplasma dengan jalur *ER dependent, membrane-initiated estrogen signaling* (Cui, *et al.*, 2013). Estrogen yang teraktivasi mampu mencegah fosforilasi,

sehingga Nf-κB tetap berpasangan dengan IκB, serta dapat mencegah terjadinya defisiensi estrogen.

## KESIMPULAN

Fraksi air daun *Marsilea crenata* Presl. memiliki aktivitas neuroprotektif ditunjukkan dengan dosis 125 dan 250 µg/ml yang dapat menurunkan ekspresi MHC II pada sel mikroglia HMC3 yang diinduksi oleh IFN-γ. Nilai *effective dose* 50 (ED<sub>50</sub>) yang mempunyai efek neuroprotektif yaitu pada dosis 0,582 µg/ml.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adityara, R.A., 2017, Uji Aktivitas Antiosteoporosis Fraksi Etil Asetat Daun *Marsilea crenata* Presl. dalam Meningkatkan Kepadatan Tulang Trabekular Femur Mencit Betina, *Skripsi*, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Agil, M., Ma'arif, B., Aemi, N.Y., 2019, Aktivitas antiosteoporosis fraksi *n*-Heksana daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekular vertebra mencit betina, *J. Tumbuh. Obat Indonesia*, 11 (7).
- Akbar, A.A., Fianto, A.Y.A., Sutikno, 2014, Penciptaan buku referensi masakan semanggi sebagai upaya pelestarian kuliner tradisional Surabaya. *Art Nouveau*, 3 (1).
- Brooks, S. A., Dwek, M., Schumacher, U., 2012, *Basic Immunochemistry for Light Microscopy*.
- 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.
- Chen, S.L., Yu, H., Luo, H.M., Wu, Q., Li, C.F., Steinmetz, A., 2016, Conservation and sustainable use of medicinal

- plants: problems, progress, and prospects, *Chin Med*, 11 (37).
- Cherry, J., Olschowka, J., O'banion, K., 2014, Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed, *J Neuroinflamm*, 11 (98).
- Cui, J., Shen, Y., Li, R., 2013, Estrogen Synthesis and Signaling Pathways During Ageing: from Periphery to Brain, *Trends Mol Med*, 19 (3): 197–209.
- Gani, I., Amalia, S., 2015 *Alat Analisis Data: Aplikasi Statistik untuk Bidang Ekonomi dan Sosial*, Penerbit ANDI: Yogyakarta.
- Green, D.S., Youn, H.A., Valencia, J.C., 2017, Current Prospect of Type II Interferon Gamma Signaling and Autoimmunity, *The Journal of Biology Chemistry*.
- Klaassen, C., Watkins, J.B., 2015, Casarett & Doull's: Essential of Toxicology, McGrawHill Medical: New York.
- Kovacs, G.G., 2014, Current concepts of neurodegenerative diseases. *EMJ Neurol*, 9.
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S.M., Belzunces, L.P., Emond, C., 2015, Non-Monotonic Dose-Response Relationship and Endocrine Disruptors: A Qualitative Method of Assessment, *Eviromental Health*, 14 (13).
- Laswati, H., 2011, Green clover potentiates delaying the increment of imbalance bone remodeling process in postmenopausal women, *Folia Medica Indonesiana*, 47: 112-117.
- Lee, W.L., Tsui, K.H., Seow, K.M., Cheng, M.H., Su, W.H., Chen, C.P., Wang, P.H., 2013, Hormone therapy for postmenopausal women-An unanswered issue, *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*, 2: 13–17.
- Ma'arif, B., Agil, M., Laswati, H., 2016, Phytochemical Assessment On n-hexane Extract and Fractions of *Marsilea crenata* Presl. Leaves through GC-MS, *Traditional Medicine Journal*, 2: 77-85.
- 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*.
- 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.
- Michel, T., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., 2013, New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources, *Planta Med*, 79: 514–532.
- Mizuno, T., 2015, Neuron-microglia interaction in neuroinflammation, *Clin Exp Neuroimmunol*, 6: 225-31.
- Nurjanah, A.A., Abdullah, A., 2012, Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif semanggi air (*Marsilea crenata*), *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*, 1 (7).
- 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).
- Rettberg, J.R., Yao, J., Brinton, R.D., 2014, Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body, *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35 : 8–30.
- Sherwood, L., 2016, Human Physiology From Cell to The System, 9<sup>th</sup> Edition, Cengage Library: Boston.

- Sirotkin, A.V., Harrath, A.H., 2014, Phytoestrogens and their effects, *European Journal of Pharmacology*, 741: 230–236.
- Tang, Y., Le, W., 2015, Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. Springer Science and Business Media: New York.
- Trisunuwati, P., 2017, Efficacy of Water Clover (*Marsilea crenata*) Extract against Blood Estrogen-Pregesterone Balance, Blood Calcium Level and Impact on Dense of Bone Tissue of Rat (*Rattus novergicus*), *Research Journal of Life Science*, 1.
- Vandeberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., 2012, Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low Dose Effect and Nonmonotonic Dose Responses, *Endocrine Reviews*, 33.
- Varshney, M., Nalvarte, I., 2017, Genes, gender, environment, and novel functions of estrogen receptor beta in the susceptibility to neurodevelopmental disorders, *Brain Sciences*, 7 (24).
- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., Maggi, A., 2016, Estrogens, Neuroinflammation and Neurodegeneration, *Endocrine Society*.
- 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., Huang, K.E., 2012, Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women, *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 51 : 229–235.