

EFEK DEKOKTA DAUN PULUTAN (*Urena lobata*) TERHADAP KADAR *Superoxide Dismutase* (SOD) JARINGAN OTAK DAN MOTILITAS IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) FASE JUVENIL YANG DIPAPAR MALATHION SECARA KRONIS

Alvian Nur Firdaus, Ariani Ratri Dewi, Yudi Purnomo*

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

E-mail: y_purnomo92@yahoo.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Malathion adalah pestisida yang memiliki efek sebagai kolinesterase inhibitor dan merupakan suatu radikal bebas yang mempengaruhi sistem saraf. Dekokta daun *Urena lobata* memiliki potensi antioksidan dan neuroprotektor. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh dekokta daun *Urena lobata* terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan kecepatan berenang ikan *Danio rerio* fase juvenil yang dipapar malathion secara kronis.

Metode: Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium secara *in vivo* dengan desain *control post group post-test only* menggunakan *Danio rerio* usia 40 hari dan dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan (n=5). Paparan diberikan selama 40 hari pada semua kelompok kecuali kelompok kontrol negatif. Dekokta daun *Urena lobata* diberikan pada P1 sebanyak 125 mg/L, P2 250 mg/L, dan P3 500mg/L. Kadar SOD diukur menggunakan WST-1 assay kit dan kecepatan berenang diamati dengan *software tracker*. Analisis data untuk SOD menggunakan *Kruskall-Wallis* dan kecepatan berenang menggunakan *one way ANOVA* dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

Hasil: Dekokta daun *Urena lobata* pada dosis 125mg/L, 250mg/L dan 500mg/L menghambat penurunan kadar SOD berturut-turut sekitar 30%, 100% dan 50% dibandingkan kontrol positif ($p < 0,05$) dan menghambat penurunan kecepatan berenang berturut-turut sekitar 50%, 60% dan 80% dibandingkan kontrol positif ($p < 0,05$)

Kesimpulan: Pemberian dekokta daun *Urena lobata* menghambat penurunan kadar SOD dan penurunan kecepatan berenang pada *Danio rerio* yang dipapar malathion kronis.

Kata Kunci: *Urena lobata*, malathion, SOD, kecepatan berenang

EFFECTS OF *Urena lobata* LEAF DECOCTION on SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) LEVELS and SWIMMING SPEED of JUVENILE *Danio rerio* EXPOSED with CHRONIC MALATHION

Alvian Nur Firdaus, Ariani Ratri Dewi, Yudi Purnomo*

Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: Malathion is a pesticide that could inhibit cholinesterase's action on acetylcholine and also producing free radicals that can affect the nervous system. Decocta of *Urena lobata* leaves has antioxidant and neuroprotective potential. This study aims to prove the effect of *Urena lobata* leaf decocta on superoxide dismutase (SOD) levels and swimming speed of juvenile *Danio rerio* exposed to chronic malathion.

Method: This is an *in vivo* experimental laboratory study with a post-test only control group design using *Danio rerio* on 40 days old divided into 2 control groups and 3 treatment groups (n = 5). The fishes exposed to malathion for 40 days in all groups except the negative control group. Decocta of *Urena lobata* leave was given to P1 at 125 mg / l), P2 250 mg / l, and P3 500mg / l. SOD levels were measured using WST-1 assay kit and swimming speed were observed with tracker software. Data for SOD was analyzed using *Kruskall-Wallis* while swimming speed using *one way ANOVA* with a significance level of $p < 0.05$

Results: Decocta of *Urena lobata* leaves at a dose of 125mg / l, 250mg / l and 500mg / l inhibits decrease of SOD levels about 30% in P1, 2-fold in P2 and 50% in P3 compared to positive control ($p < 0,05$), and also of swimming speed about 50% in P1, 60% in P2 and 80% in P3 compared to positive controls ($p < 0,05$).

Conclusion: *Urena lobata* leaves decocta was able to inhibit decrease of SOD levels and swimming speed of *Danio rerio* chronically exposed to malathion.

Keywords: *Urena lobata*, malathion, SOD, motility

*Correspondence to:

Yudi Purnomo

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

Jl. MT Jaryono 193 Malang City, East Java, Indonesia 65145

E-mail: y_purnomo92@yahoo.com

PENDAHULUAN

Pestisida adalah senyawa sintetik yang digunakan untuk mengendalikan berbagai hama. Pestisida yang sering digunakan di Indonesia salah satunya adalah malathion.¹ Karakteristik malathion yaitu berbentuk cairan emulsi, berwarna kuning pucat, dan berbau.² Kelebihan malathion adalah mudah terdegradasi dan tidak lebih toksik jika dibandingkan dengan organoklorin dan mempunyai nilai *Lethal Dose-50* (LD-50) 1400 mg/kg.³ Malathion memiliki tingkat toksisitas ringan namun apabila digunakan secara tidak tepat dan berlebihan akan meningkatkan resiko efek sampingnya.⁴ Pestisida malathion masuk ke dalam tubuh melalui inhalasi, membran mukosa dan saluran gastrointestinal.³ Dalam tubuh malathion diubah menjadi malaaxon oleh hepar.⁵ Mekanisme kerja utama malaaxon adalah menghambat enzim asetilkolinesterase sehinggajadi akumulasi asetilkolin pada sistem saraf, salah satunya adalah otak.³ Penumpukan ini menyebabkan beberapa gejala seperti kejang, paralisis otot, kram bahkan kematian.² Perubahan malathion menjadi malaaxon menghasilkan produk samping yaitu radikal bebas.³ Kadar radikal bebas yang tinggi akan menyebabkan kondisi stres oksidatif jika tidak diimbangi oleh antioksidan. *Super Oxide Dismutase* (SOD) merupakan antioksidan endogen yang menetralkan radikal bebas dan juga sebagai penanda kerusakan oksidatif jaringan.⁵

Pulutan (*Urena lobata*) merupakan salah satu herbal yang memiliki khasiat terapi.⁶ Di masyarakat daun pulutan secara tradisional digunakan untuk pengobatan penyakit seperti influenza, radang tonsil, keputihan, demam dan malaria.⁷ Pada uji preklinik sebelumnya telah ditemukan bahwa daun pulutan memiliki potensi sebagai antioksidan dengan menangkalkan senyawa radikal bebas yaitu flavonoid.⁶ Efek antioksidan senyawa flavonoid melalui penangkapan radikal bebas melalui donor proton hidrogen dari gugus hidroksil flavonoid.⁸ Aktivitas antioksidan pada flavonoid terutama dipengaruhi substitusi gugus hidroksi pada posisi orto dan para terhadap gugus OH dan OR.⁷ Hinggasaat ini belum pernah dilakukan penelitian mengenai potensi daun pulutan dalam menghambat kerusakan sistem saraf pusat akibat paparan malathion sehinggaperlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Ikan zebra merupakan salah satu hewan coba yang dapat digunakan sebagai model penelitian di bidang toksikologi.⁹ Penggunaan ikan zebra sebagai hewan uji memiliki beberapa keuntungan antara lain sensitif terhadap senyawa xenobiotik dari lingkungan, mudah berkembang biak.¹⁰ Ikan zebra memiliki neurotransmitter yang sama dengan manusia seperti asetilkolin.¹¹ Ikan zebra juga digunakan untuk penelitian penyakit neurodegeneratif seperti Parkinson dan Alzheimer

karena kedekatan homologi dan fungsi otak ikan zebra yang terkonsevasi terkait etiologi penyakit neurodegeneratif antara ikan zebra dan manusia.¹⁰ Masa juvenil ikan zebra merupakan fase tumbuh kembang yang rentan terhadap senyawa xenobiotik yang dapat mengganggu tumbuh kembangnya.¹² Berdasarkan latar belakang diatas maka perlu dilakukan penelitian mengenai pemberian ekstrak daun pulutan untuk menghambat kerusakan oksidatif ikan zebra fase juvenil yang dipapar malathion secara kronik, dalam hal ini terhadap motilitas dan kadar SOD jaringan otak ikan zebra.

METODE

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium secara *in vivo* dengan desain *control group post-test only*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, pada Bulan Februari hingga April 2019. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 1074-KEP-UB tahun 2019.

Pemeliharaan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba ikan *Danio rerio* fase juvenil (usia 1-2 bulan) yang telah disertifikasi oleh Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga dengan nomor 005/ULMKILP/UA.FPK/03/2019. Jumlah *Danio rerio* yang digunakan adalah 25 ekor. *Danio rerio* dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. *Danio rerio* diberi pencahayaan 14 jam terang dan 10 jam gelap, suhu air sekitar 26°C, dan dipasang aerator. Pemberian pakan pada hewan coba dilakukan setiap hari sekali dengan dosis pemberian 4% BB/hari.

Pemberian Malathion

Malathion Rider® 500 g/L diencerkan hinggadidapatkan konsentrasi 2,5 mg/L dan dipaparkan selama 40 hari pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Dosis mengacu pada penelitian Cook *et al* (2005) dengan sedikit modifikasi.¹³

Pembuatan Dekokta Daun Pulutan

Simplisia daun *Urena lobata* didapatkan dari UPT Balai Materia Medika, Kecamatan Batu, Kota Batu, Jawa timur dan telah disertifikasi dengan nomor 074/096A/102.7/2019. Simplisia daun urena lobata ditimbang seberat 5gram dimasukkan dalam panci dekok berisi 500 ml air yang sudah dipanaskan pada suhu 90°C selama 30 menit. Dekokta ditunggu hinggadingin kemudian diperas ke dalam labu Erlenmeyer. Hasil perasan selanjutnya diencerkan hinggadidapatkan konsentrasi 125 mg/L, 250 mg/L, dan 500 mg/L.

Penentuan dosis berdasarkan dari penelitian Purnomo *et al.* (2015) dengan sedikit modifikasi.¹⁴

Pengukuran Motilitas Ikan Zebra

Pengukuran dilakukan setelah perlakuan 40 hari. Ikan dimasukan ke aquarium kemudian dilakukan perekaman menggunakan kamera selama 1 menit untuk setiap hewan coba dalam setiap kelompok. Perubahan motilitas kemudian dianalisis dengan *software tracker* untuk melihat perubahan yang terjadi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perubahan motilitas dihitung dalam satuan cm/detik.

Pengorbanan Hewan dan Pengambilan Sampel Hewan Coba

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara pembedahan. Ikan ditaruh diatas nampan sampai ikan tidak sadar diri selanjutnya dibedah dan diambil organ otaknya dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -40°C.

Pengujian Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) Jaringan Otak

Pada *sample well* ditambahkan 20 µl sampel, *enzyme working solution* 20µl dan 200 µl *substrate application solution*. Semua sampel dicampurkan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit kemudian diukur nilai absorbansi menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

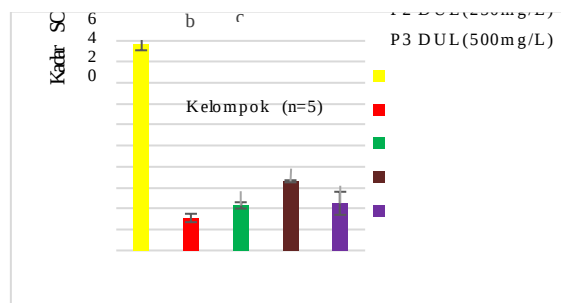
Analisis Data

Analisis data menggunakan *software* SPSS versi 16. Perbedaan antar kelompok dianalisis dengan uji *One Way Anova* dan dilanjutkan uji *Post Hoc LSD* pada pengujian kadar SOD, sedangkan uji beda kecepatan berenang menggunakan *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney*. Data dinyatakan berbeda signifikan bila nilai $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN

Kadar SOD Otak *Danio rerio* yang Dipapar *Urena lobata*

Efek dekokta daun *Urena lobata* terhadap kadar SOD jaringan otak *Danio rerio* yang dipapar malathion secara kronis dapat dilihat pada Gambar



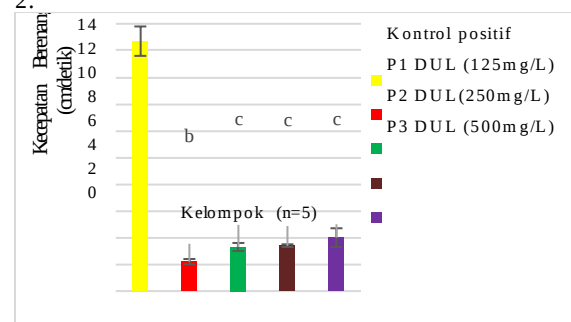
Gambar 1. Histogram Efek Dekokta Daun *Urena lobata* terhadap Kadar SOD Otak *Danio rerio* Juvenil yang Dipapar Malathion secara Kronik

Keterangan: Data dalam rerata ± standar deviasi (SD). a,b,c,d Notasi berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Pemberian malathion menurunkan kadar SOD otak kurang lebih 8 kali lipat dibandingkan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Pemberian dekokta daun *Urena lobata* dosis 125 mg/L, 250 mg/L, dan 500 mg/L menghambat penurunan kadar SOD otak *Danio rerio* yang dipapar malathion berturut-turut sekitar 40%, 100%, dan 50% dibandingkan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$). Pemberian dekokta daun pulutan dosis 250 mg/L lebih kuat menghambat dibandingkan dosis 125 mg/L dan dosis 500 mg/L ($p < 0,05$).

Kecepatan Berenang *Danio rerio* yang Dipapar *Urena lobata*

Efek dekokta daun *Urena lobata* terhadap kecepatan berenang *Danio rerio* yang dipapar malathion secara kronis dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Histogram Efek Dekokta Daun *Urena lobata* terhadap Kecepatan Berenang *Danio rerio* Juvenil yang Dipapar Malathion secara kronik

Pemberian malathion menurunkan kecepatan berenang kurang lebih 90% dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Pemberian dekokta daun *Urena lobata* dosis 125 mg/L, 250 mg/L, dan 500 mg/L menghambat penurunan kecepatan berenang *Danio rerio* yang dipapar malathion kronis berturut-turut sekitar 50%, 60%, dan 80% dibandingkan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$). Dekokta daun *Urena lobata* dosis 125 mg/L, 250 mg/L dan 500 mg/L tidak berbeda signifikan dalam menghambat penurunan kecepatan berenang ikan zebra ($p > 0,05$).

Korelasi Kadar SOD Jaringan Otak Dengan Kecepatan Berenang Ikan Zebra yang Dipapar Malathion Secara Kronik

Terdapat korelasi yang signifikan antara kadar SOD jaringan otak dengan kecepatan berenang ikan zebra ($P < 0.05$) dengan kekuatan korelasi sebesar ($R = 0,660$) yang termasuk dalam kategori kuat seperti yang ditunjukkan dalam tabel 1

Tabel 1. Korelasi Kadar SOD Jaringan Otak dengan Kecepatan Berenang *Danio rerio* yang Dipapar *Urena lobata*

Correlations		SOD	Motilitas
SOD	Pearson Correlation	1	.660**
	Sig. (2-tailed)		.002
	N	20	20
Motilitas	Pearson Correlation	.660**	1
	Sig. (2-tailed)	.002	
	N	20	25

** . Korelasi signifikan antar Variabel ($p < 0,01$).

PEMBAHASAN

Efek Paparan Malathion secara Kronik terhadap Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) Jaringan Otak dan Kecepatan Berenang *Danio rerio*

Pemberian malathion secara kronis pada ikan zebra juvenile menurunkan kecepatan berenang dan kadar SOD jaringan otak. Hal ini dapat terjadi karena malathion menghambat aktifitas asetilkolinesterase dan hasil metabolisme dari malathion menghasilkan produk samping berupa radikal bebas.¹⁵

Malathion di hepar akan dimetabolisme dibantu oleh enzim *cytochrome* p-450 menjadi malaaxon dan menghasilkan produk samping radikal bebas yaitu O_2^- .³ *Superoxide dismutase* (SOD) adalah enzim detoksifikasi pertama dalam sel dan merupakan antioksidan endogen penting yang bertindak sebagai komponen sistem pertahanan lini pertama terhadap spesies oksigen reaktif (ROS). SOD berkerja dengan mengkatalis pemutusan dua molekul anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan molekul oksigen (O_2) yang mengakibatkan anion superoksida yang berpotensi berbahaya menjadi kurang berbahaya.¹⁶ *Hydrogen peroxide* lebih stabil dan mudah untuk berdifusi melewati membran plasma dan selanjutnya hidrogen peroksida dapat berubah menjadi radikal hidroksil dengan bantuan besi yang disebut reaksi Fenton.^{3, 17, 18}

Malaoxon adalah metabolit yang 22 kali lebih toksik dari malathion.³ Malaoxon menghambat kerja enzim asetilkolinesterase sehingga menyebabkan penumpukan asetilkolin pada *nerve junction*, ketika terjadi hambatan pada enzim Asetilkolinesterase maka kadar asetilkolin akan meningkat dan menyebabkan stimulasi terus menerus pada reseptor muskarinik dan nikotinik. Overstimulasi pada reseptor nikotinik akan menyebabkan kontraksi berlebihan pada otot skelet sehingga menimbulkan gejala kejang atau

paralysis²⁷. Efek tersebut akan menurunkan kecepatan berenang ikan zebra.²⁰ Selain itu overstimulasi pada reseptor muskarinik akan menimbulkan gejala seperti bradikardi, peningkatan peristaltik usus dan bronkospasme²⁸.

Peningkatan radikal bebas juga dapat mempengaruhi sistem saraf terutama pada sinyal *Redox* yang berperan untuk menstimulasi diferensiasi neuron dan pembentukan axon.⁴ Hal ini menyebabkan gangguan transmisi sinyal dari otak ke otot motorik sehinggakordinasi gerakan akan terganggu. Apabila sel saraf tersebut mengalami kerusakan maka terjadi gangguan pada fungsi motorik mengakibatkan penurunan kecepatan berenang.²¹

Efek Dekokta Daun Pulutan *Urena lobata* terhadap Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) Jaringan Otak *Danio rerio* Juvenile yang Dipapar Malathion secara Kronik

Dekokta daun *Urena lobata* dapat menghambat penurunan kadar SOD. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh kandungan senyawa antioksidan yang berperan sebagai penangkal radikal bebas.¹⁰

Dekokta daun *Urena lobata* mengandung beberapa senyawa flavonoid, yaitu *Kaempferol*, *rutin*, *quercetin*, *afzelin*, *astragalin*, *tilirosida*, *kaempferol-3-O-D-glikoperosida-7-aL rhamn osida*, *kaempferol-7O-a-Lrhamnosida*, *kaepferol-7-O-a-L-rhamnoside-4'-O-D-glikoperosida*, dan *crenulosida*²⁰. Penelitian Dixa singh (2014) menunjukkan bahwa pada uji fitokimia daun pulutan mengandung senyawa *Quercetin* dan *kaempferol* sebagai salah satu senyawa flavonoid memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan cara mendonorkan atom H pada senyawa radikal tersebut²⁷. *Quercetin* juga mengaktifkan *Nrf2* dengan mekanisme yang disebut *dose response phenomenon* dengan cara *quercetin* memberikan sedikit *stress stimulant* sehingga *Nrf2* merespon dengan menginduksi transkripsi molekul antioksidan utama yaitu heme oxygenase, glutamate, glutathion S-transferase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase, sulfiredoxin dan thioredoxin sehingga produksi enzim antioksidan meningkat dan menurunkan kondisi stress oksidatif.²²

Pemberian dekokta daun *Urena lobata* dosis 125 mg/L memiliki efek menghambat yang lebih rendah dibandingkan dengan dosis 250 mg/L. Hal ini sesuai dengan teori farmakologi bahwa peningkatan dosis dapat meningkatkan efek biologis. Dosis 250 mg/L mampu menghambat penurunan kadar SOD jaringan otak lebih baik dibandingkan dosis 500mg/L. Hal ini diduga karena kandungan quercetin sebagai antioksidan berubah menjadi prooksidan. Hal ini didukung oleh penelitian munawwaroh tahun 2019 bahwa pada dosis 250mg/L mampu menghambat penurunan kadar SOD lebih kuat dibandingkan dengan dosis 500mg/L.

Efek Dekokta Daun *Urena lobata* Terhadap Kecepatan Berenang *Danio rerio* Juvenile yang Dipapar Malathion secara Kronik

Pemberian dekokta daun *Urena lobata* mampu menghambat penurunan kecepatan berenang ikan *Danio rerio*. Hal ini kemungkinan disebabkan kandungan daun *Urena lobata* yang berpotensi sebagai antikolinergik dan neuroprotektor.²³

Dalam daun pulutan terdapat senyawa aktif *quercetin* yang bersifat antikolinergik dan neuroprotektor.²⁴ Senyawa ini bekerja dengan meningkatkan aktivitas AChE sehingga mempercepat hidrolisis neurotransmitter asetilkolin menjadi kolin dan asam asetat, dan mencegah penumpukan asetilkolin yang berakibat pada penurunan kecepatan berenang.¹⁹ Quercetin juga berperan sebagai neuroprotektor dengan mencegah radikal bebas agar tidak mengganggu sinyal Redox yang penting untuk diferensiasi neuron dan pembentukan axon.²² Senyawa tersebut penting untuk menjaga fungsi kordinasi gerakan dan mencegah penurunan kecepatan berenang. Huang et al (2014) mengatakan respon yang diberikan ikan zebra terhadap suatu zat dapat dilihat pada kecepatan berenang, kemampuan berkoloni dan kepekaan terhadap rangsang.

Pemberian dekokta daun *Urena lobata* pada dosis 125mg/L, 250mg/L dan 500 mg/L mampu menghambat penurunan kecepatan berenang dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, namun tidak memberikan perbedaan yang signifikan di setiap dosisnya. Perubahan motorik terjadi akibat peningkatan dosis atau lamanya paparan suatu zat. Huang et al (2014) mengatakan respon yang diberikan ikan zebra terhadap suatu zat dapat dilihat pada kecepatan berenang, kemampuan berkoloni dan kepekaan terhadap rangsang.²⁰ Perbedaan yang tidak signifikan dari setiap dosis dekokta daun *Urena lobata* pada penelitian ini mungkin disebabkan oleh mekanisme *down regulation* dan desentisasi. Mekanisme *down regulation* yaitu penurunan jumlah reseptor akibat peningkatan dosis suatu zat aktif sehingga efek biologisnya menurun. Desentisasi merupakan penurunan kepekaan reseptor akibat stimulasi zat aktif tinggi dan jangka lama sehingga aktivitasnya menurun.²⁶ Perkembangan serat otot putih pada ikan zebra fase juvenile yang berperan untuk gerakan cepat masih belum sempurna karena masih dalam tahap perkembangan.²⁵

KESIMPULAN

1. Pemberian dekokta daun pulutan (*Urena lobata*) dengan dosis 125mg/L, 250 mg/L dan 500mg/L mampu menghambat penurunan kadar SOD jaringan otak dan menghambat penurunan kecepatan berenang ikan zebra yang dipapar malathion secara kronik
2. Hasil uji korelasi antara kadar SOD jaringan otak dengan kecepatan berenang ikan zebra

menunjukkan adanya korelasi positif kuat ($r=0,660$) dan signifikan ($p<0,05$)

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, guna pengembangan lebih lanjut peneliti menyarankan untuk:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut efek daun pulutan dengan metode yang berbeda seperti maserasi, infundasi, perkolasi dan destilasi
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada hewan coba dengan tingkat yang lebih tinggi seperti tikus

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada IOM dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah memberikan bantuan dana penelitian, dan tim penelitian yang telah membantu pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rudolf T, James B. Malathion, United States. Report No.133 pubchem.ncbi.nlm.nih. gov/compound. 2019 May 5.
2. Hamzah AH. *Tracer pathway* dari insektisida malathion dan pengaruhnya terhadap organ hati dan otak tikus. Makara Kesehatan 2009;13(2):69-73.
3. Tchounwou PB, Patlolla AK, Yedjou CG, Moore PD. Environmental exposure and health effects associated with malathion toxicity. In: toxicity and hazard of agrochemicals. United States 2015; pp 71-83.
4. Thiago F. Reactive oxygen species physiological and phsiopatological effect on synaptic plasticity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2008;13(9):23-28.
5. Fukai T. Superoxide dismutase role in redox signaling, vaskular function and disease. Antioxidant & Redox Signaling 2011;15:22-29.
6. Babu SP, Madhuri DB, Ali SL. A pharmacological review of *Urena lobata* plant. Asia Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2016;9(2).
7. Islam M, Uddin MA. A revision on *Urena lobata* L. International Journal of Medicine 2017;5(1):126-131.
8. Handayani n, tenzer a. Potensi Rebusan Simplisia Daun Pulutan (*Urena lobata* L) sebagai bahan antifertilitas ditinjau dari pengaruhnya terhadap sistem reproduksi mencit (*Mus musculus*) Balb- C. Abstrak Laporan Penelitian Hibah Bersaing. 2014;(1):85– 91.

9. Rubangi M. Dekokta daun pulutan *Urena lobata* pada ikan zebra *Danio rerio* dewasa studi LC50 dan kecepatan berenang. Skripsi FK UNISMA. Malang 2017.
10. Xi Y, Yu M, Goday R. Transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein in dopaminergic neurons of ventral diencephalon. *America Association of Anatomy* 2011; (11): p. 240.
11. Zhou J, Guo SY, Zhang Y, Li CQ. Human prokinetic drugs promote in zebrafish, neurogastroenterology & motility. 2014; 26 (4) :589-595.
12. Hsu CH, Wen ZH. The zebra fish model: use in studying cellular mechanism for a spectrum of clinical disease entity. *Curr Neurovascular* 2013;33(2):111-120.
13. Cook L, Paradise CJ, Lom B. The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005;24(7):17-45.
14. Purnomo Y, Soeatmadji DW, Sumitro SB, Widodo MA. Anti-diabetic potential of *Urena lobata* leaf extract through inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2015;5(8): 645–649.
15. Biro Pusat Statistik. Tingkat pengetahuan petani terhadap penggunaan pestisida. Balai Penelitian Lingkungan. Boyolali. 2007;p. 19.
16. Dhanapal R, Ratna JV, Gupta M, Sarathchandran I. Preliminary study on *Urena lobata* used in Indian traditional folk medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2012;89(5):201-208.
17. Ighodaro OM, Akinley G. First line defence antioxidants superoxide dismutase. *Alexandria Journal of Medicine* 2015;23:287-293.
18. Mathappan R, Umachiggi SP. Antioksidan activity of the methanolic and aqueous extracts of *Urena lobata* (Linn) by DPPH method. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2013;5(1):51-58.
19. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioksidans in disease and health. *IJBS* 2008;4(2):89–96.
20. Huang Y, Jinsong Z, Xiaobo H, Tinglin H. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014;11:3650-3660.
21. Bencan Z, Sledge D. Buspirone and diazepam effect in a zebrafish model anxiety. *Pharmacol Biochem* 2009;94(1):75-80.
22. Lucio G, Costa J. Mechanism of neuroprotection by quercetin counteracting oxidative stress and more. *Department of Neuroscience* 2016;78(4):122-128.
23. Lutterodt GD. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrheal diseases. *J Ethnopharmacol* 1989;25(4):235-239.
24. Fatima H, Luciane R. Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzyme and acetylcholinesterase activity in cerebral cortex synaptosome of cadmium exposed rats. *Mol Biochem* 2013;381:1-8.
25. Magda D, Malgozrata D. Zebrafish: a model for the study of toxicants affecting muscle development and function. *International Journal of Molecular Science* 2016;123:57-61
26. Ganong, W.F. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 22. Jakarta: EGC.2009.
27. Iswandi E. Inhibitor Asetilkolinesterase untuk menghilangkan efek relaksan otot non-depolarisasi. *National Brain Center Indonesia*, 2017, Vol 39 no. 5
28. Dixa Singh, V. S. Singh. *Urena lobata*: A Green Source of Anti-Oxidant. *Journal of Plant Sciences*. Vol. 2, No. 6, 2014, pp. 299-303.