

**Pengaruh Ekstrak Metanolik (*Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans) yang
Diberikan Secara Subkronik 90 Hari Pada Tikus Betina (*Rattus
norvegicus*) Terhadap Necrosis Otak**

***Metanolic Extraction of (*Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans) Effect which is
given 90-Days Sub-chronic on Female Rats (*Rattus norvegicus*) toward
Necrosis of Brain***

Laili Mihmidati^{1*)}, Nour Athiroh^{2**)}
¹², Jurusan Biologi FMIPA UNISMA, Indonesia

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh EMSA (Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans) terhadap nekrosis otak tikus (*Rattus norvegicus*) betina secara subkronik 90 hari. Metode penelitian ini menggunakan *True Experimental Design* dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sampel yang digunakan sebanyak 40 ekor tikus, dengan dibagi 4 perlakuan, 1 kelompok kontrol (tanpa diberi EMSA) 3 kelompok perlakuan dengan diberi EMSA yang bertingkat yaitu 250 mg/KgBB, 500 mg/KgBB dan 1000 mg/KgBB. Pada hari ke-90 tikus dikorbankan, tikus dibius kemudian dilakukan pengamatan secara makropatologi, ditimbang (bobot absolut) dengan dikeringkan terlebih dahulu menggunakan kertas penyerap. Data yang di analisis adalah bobot relatif, yaitu bobot organ absolut dibagi bobot badan. Organ yang diperiksa histopatologi yang diamati adalah organ otak. Setiap organ dan jaringan yang sudah dipisahkan dimasukkan dalam larutan formalin 10% dan dibuat preparat histopatologi untuk di periksa dibawah mikroskop. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian EMSA pada perlakuan tikus kontrol (tanpa perlakuan) tidak berbeda nyata dibandingkan dengan tikus perlakuan, sehingga EMSA aman, tidak toksik, terhadap tikus betina sebab zat aktif yang terkandung dalam EMSA.

Kata kunci: Otak, Nekrosis, Benalu Teh

ABSTRACT

The goals of this research is to know the MESA (Methanolic Extraction of *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans) effect toward necrosis of brain in female rats (*Rattus norvegicus*) by sub-chronic of 90 days. The method of this research uses true experiment with complete randomized design (CRD). The samples which are used are 40 rats that divided into 4 treatments, a control group (without exposed by MESA) and 3 treatment groups are exposed by multilevel of MESA those are 250 mg/Kg BW, 500 mg/Kg.BW and 1000 mg/Kg.BW. In the 90th day, the rats are sacrificed, the rats are anesthesia then are observed by macro-pathology, weighing (absolute weight) with be dried using absorbent paper. Data analysis is relative weight that is weight of absolute organs divided by body weight. Organs examined histopathologies which are observed are brain organs. Every organs and tissues were separated, entered into formaldehyde solution 10% and made histopathology preparations for examined under microscope. The result of this research is shown that giving MESA between groups of treatment compared to group of control are not significant. That means is not getting toxic toward female rats because the active substances contained in MESA.

Keyword: Brain, Necrosis, Mistle Toe

^{*)} Laili Mihmidati. Jurusan Biologi FMIPA UNISMA. Jl. MT. Haryono 193, Malang 65144
Telp. 085706503673 email: lailidatin19@gmail.com

^{**)} Dr. Nour Athiroh AS. Jurusan Biologi FMIPA UNISMA. Jl. MT. Haryono 193, Malang 65144
Telp. 08133017206 email: nur_athiroh_mlg@yahoo.co.id

Diterima Tanggal 5 Juli 2017 – Publikasi Tanggal 5 Oktober 2017

Pendahuluan

Tanaman obat biasanya dimanfaatkan sebagai pengobatan tradisional. pengobatan tradisional merupakan pengobatan yang menggunakan bahan-bahan yang berasal dari tumbuhan yang terdapat di alam sekitar [1]. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai tanaman obat yaitu benalu teh (*Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans) dari suku *Lorantaceae* dan mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, quersetin tanin, glikosida, alkaloid, *saponin*, dan inulin, zat aktif tersebut telah dilaporkan memiliki peranan pada penyakit hipertensi [2]. Berdasarkan uji invitro benalu teh mampu menurunkan kontraktilitas pembuluh darah arteri ekor tikus melalui peran endotel melalui mekanisme rendotelisasi [3,4]. Dan secara invivo Benalu teh mampu berperan sebagai antihipertensi melalui mekanisme perbaikan *stress oksidative* dan *disfungsi endotel* pada tikus model hipertensi yang diinduksi oleh DOCA (*Deoxycorticosterone acetate*) garam [5,6,7].

Penelitian selanjutnya yaitu tentang tikus yang diberi dengan EMSA selama 28 hari (subkronik) tidak menunjukkan adanya abnormalitas pada pemeriksaan histopatologi dan tidak ada efek yang ditimbulkan dibandingkan dengan tikus kontrol pada serum biokimia klinis pada liver tikus jantan [8]. Begitu pula pada penelitian terbaru tentang uji toksisitas subkronik (selama 28 hari) benalu teh dengan tikus betina juga tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara tikus kontrol dan tikus perlakuan terhadap trigliserida, kadar protein total, albumin, kreatinin, SGOT (*Serum Glutamate Oksaloasetat Transaminase*) serta SGPT (*Serum Glutamate Pyruvic Transaminase*) [9,10,11,12,13]. Pemberian EMSA juga cenderung meningkatkan aktifitas SOD (*Superoxide Dismutase*) serta menurunkan konsentrasi MDA (*Malondialdehyde*) sehingga diduga dapat mengurangi stress oksidatif pada mencit [14].

Suatu sediaan juga harus dilakukan uji toksisitas subkronis dengan melakukan pemeriksaan biokimia klinis dan histopatologi. Pemeriksaan histopatologi perlu dilakukan untuk mengetahui adanya kerusakan pada organ-organ tertentu, salah satunya yaitu otak [15]. Otak lebih rentan terhadap stress oksidatif. Apabila membran sel terganggu, pemulihan sel-sel otak tidak mungkin terjadi. Radikal bebas sangat toksik bagi sel. Pembentukan radikal bebas dan protease akan mengganggu membran sel otak dan akan menyebabkan kerusakan atau nekrosis yang ireversibel [16]. Nekrosis otak merupakan kerusakan sel-sel yang terjadi pada otak.

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian “Studi Pemberian EMSA Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina Strain Wistar Selama 90 Hari (Subkronik) Terhadap Necrosis Otak”.

Material dan Metode

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kering *Scurrula atropurpurea* (Bl) Dans yang telah diidentifikasi di Balai Materia Medica Batu, sekam, pakan tikus (susu pap/buras), akuades untuk minum tikus, metanol teknis 90%, anastesi eter, formalin 5%, xylol, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, parafin, phospat buffer sulin, H₂O₂, 0,3% dalam metanol, sitrat buffer, tikus betina (*Rattus norvegicus*) umur 2 bulan, dengan berat badan 200-300 gram, preparat otak, minyak emersi untuk perbesaran 1000x.

Alat yang digunakan adalah kandang tikus ukuran 40x30 cm, penutup kandang dari anyaman kawat, botol minuman tikus, timbangan analitik merk HWH dengan type DJ 6002 A / DJ302A, blender 8010BU model HGBTWT, loyang, oven memmert dengan type UNB 400, *freezer polytron rotary vacum evaporator*, botol aqua, botol selai, lebel, gelas *beaker*, gelas erlenmeyer, corong, alat sonde, alat tulis, gunting, pinset, papan tempat pembedahan tikus/parafin, alat sectio, spuit injeksi, jarum untuk fiksasi tikus, tabung penyimpanan organ, kertas label, *microptome*, gelas objek dan *cover glass*, counterstain dengan mayer-hematoksilin, tempat sampah, masker, *handscoon*, mikroskop olympus binokuler, camera digital canon powershot A2600.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian dengan menggunakan *True Experimental Design* dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data penelitian dimasukkan kedalam tabel dan dilakukan analisis menggunakan SPSS versi 15.0. Perbedaan signifikan antara rata-rata dianalisa menggunakan *one-way analysis of variance* (ANOVA) dan dilanjutkan tes Duncan untuk membedakan dengan kelompok kontrol dan perlakuan dengan taraf kepercayaan 95% $P_{(<0,05)}$.

Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan nomor:369/EC/KEPK/06/2015.

Cara Kerja

Pembuatan Simplisia: Sampel yang digunakan adalah daun benalu teh *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans yang diperoleh dari Kota Kepanjen Malang dan dilakukan identifikasi di Balai Materia Medica Batu, kemudian dicuci dan di oven pada suhu 40-60°C, dengan tujuan untuk menghilangkan kadar air, setelah itu daun dipotong menjadi kecil kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender agar mendapatkan simplisia yang halus.

Ekstraksi: Metode ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. 100 mg simplisia daun benalu teh direndam sampai 1 liter metanol 90% di dalam erlenmayer agar mendapatkan zat aktif yg terdapat di daun benalu teh. Campuran tersebut dikocok selama ± 1 jam hingga homogen agar larutan mengendap, larutan didiamkan selama 1 x 24 jam. Kemudian Larutan bagian atas (supernatant) merupakan zat aktif benalu teh yang telah diikat oleh metanol, kemudian dipindah pada labu Erlenmeyer lain (sebagai stok). Sisa endapan dilakukan perendaman kembali dengan menggunakan larutan metanol 90% sebanyak 3x pengulangan. Supernatan kemudian dijadikan ekstrak dengan cara diuapkan dengan menggunakan *Rotary evaporator* [5,6,7,8].

Pemeliharaan Hewan Coba: Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama 7 hari di kandang laboratorium faal FK UB dengan suhu ruangan 25-27°C. Sampel yang digunakan sebanyak 40 ekor tikus. Dengan dibagi 4 perlakuan, 1 kelompok kontrol (tanpa dipapar EMSA) 3 kelompok perlakuan dengan dipapar EMSA yang bertingkat yaitu 250 mg/KgBB, 500 mg/KgBB dan 1000 mg/KgBB.

Pembedahan, Penimbangan Organ dan Pemeriksaan Histopatologi: Pada hari ke-90 tikus dikorbankan, tikus dibius dengan cara dimasukkan ke dalam box yang telah diberi eter, kemudian dilakukan pengamatan secara makropatologi secara seksama untuk setiap organ. Organ yang akan ditimbang (bobot absolut) harus dikeringkan terlebih dahulu dengan kertas penyerap. Sedangkan data yang dianalisis adalah bobot relatif, yaitu bobot organ absolut dibagi bobot badan. Organ yang diperiksa histopatologi yang diamati adalah organ otak. Setiap organ dan jaringan yang sudah dipisahkan segera diawetkan dengan dimasukkan dalam larutan dapar formalin 10% sampai semua bagian organ tenggelam dan dibuat preparat histopatologi dengan cara organ dipotong dan dilakukan pencucian bertingkat menggunakan xylol, alkohol 70%, alkohol 80%, dan alkohol 95%. Kemudian organ dipadatkan dengan parafin dan dipotong dengan microtome. Selanjutnya organ ditempelkan pada kaca menjadi slide histopatologi dengan teknik pewarnaan HE (Hematoxylin-Eosin) kemudian di periksa dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x, diamati sel neuron dan dihitung nekrosis selnya.

Hasil dan Diskusi

Hasil Penelitian

Benalu teh yang diperoleh dari Kepanjen Malang diproses untuk mendapatkan simplisia halus yang selanjutnya diekstrak menggunakan metode maserasi dengan tujuan untuk mengambil zat aktif dalam daun kering benalu teh. EMSA yang telah diperoleh diperlakukan ke tikus betina yang berumur

2 bulan dikarenakan tujuan dari serangkaian penelitian ini adalah sebagai minuman pendamping obat. Pengamatan histopatologi dilakukan setelah 90 hari berikutnya dikarenakan penelitian ini merupakan penelitian subkronik 90 hari [15]. Data dianalisis menggunakan ANOVA yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Perhitungan Kerusakan Sel (Nekrosis) Otak Tikus Wistar Betina Setelah Pemberian EMSA Selama 90 Hari

No	Perlakuan	Nekrosis Otak			Rerata ± SD	value
		Ulangan				
		1	2	3		
1	Kontrol	31,33	32	40,33	34,55 ± 5,01 ^a	0,016
2	P1	36	35,33	38	36,44 ± 1,38 ^a	
3	P2	31	23,33	22,67	25,66 ± 4,63 ^a	
4	P3	36,33	35,67	36,33	36,11 ± 0,38 ^a	

Keterangan:

K (Kontrol) : Tikus tanpa pemberian EMSA

P1 (Perlakuan 1) : Tikus perlakuan dengan dosis EMSA 250 mg/KgBB

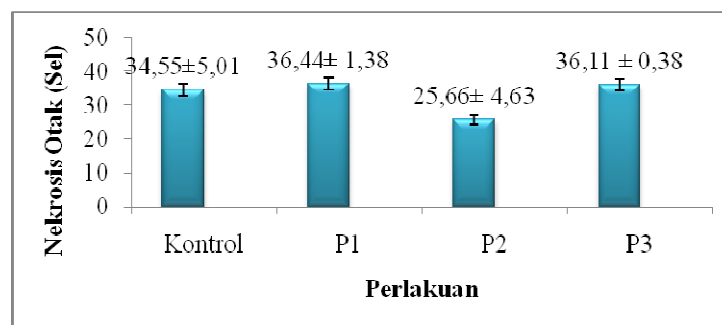
P2 (Perlakuan 2) : Tikus perlakuan dengan dosis EMSA 500 mg/KgBB

P3 (Perlakuan 3) : Tikus perlakuan dengan dosis EMSA 1.000 mg/KgBB

Berdasarkan hasil uji ANOVA ($p > 0.05$)

(^a) Secara signifikan semua perlakuan P1, P2, P3 tidak berbeda nyata dengan kontrol

Berdasarkan Tabel 1 rerata kerusakan sel (nekrosis) otak pada kelompok kontrol (K) yaitu kelompok tikus tanpa perlakuan atau tanpa diberi EMSA menunjukkan rerata adalah 34,55. Sedangkan pada kelompok perlakuan 1 (P1) yaitu kelompok tikus perlakuan diberi EMSA dengan dosis 250 mg/KgBB reratanya adalah 36,44. Kemudian kelompok perlakuan 2 (P2) yaitu kelompok tikus dengan diberi EMSA dosis 500 mg/KgBB reratanya adalah 25,66 dan kelompok perlakuan 3 (P3) yaitu kelompok tikus dengan diberi EMSA dosis 1.000 mg/KgBB reratanya adalah 36,11.



Gambar 1. Histogram kelompok perlakuan tikus betina terhadap rerata kerusakan sel (nekrosis) otak.

Berdasarkan uji ANOVA dengan SPSS versi 15.0 menunjukkan bahwa semua kelompok kontrol ($p > 0.05$) dengan nilai signifikansi 0,016, maka H_a diterima sehingga H_0 ditolak artinya Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans berpengaruh terhadap kerusakan sel (nekrosis) otak tikus betina. Maka perlu dilanjutkan dengan uji Tes Duncan dan hasil dari Tes Duncan menyatakan bahwa kelompok P1 nilainya 63,55, P3 nilainya 63,88 dan kontrol nilainya 65,44 menunjukkan bahwa nilainya tidak jauh beda sedangkan untuk P2 nilai ujinya 74,33. Hal ini menunjukkan bahwa dosis EMSA dosis 500 mg/KgBB lebih efektif untuk organ otak terhadap kerusakan sel (nekrosis) tikus betina.

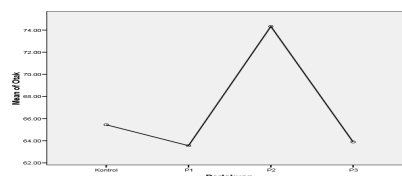
Tabel 2. Hasil Analisis SPSS dengan Tes Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Tukey HSD ^a	P1	63.5556	
	P3	63.8889	
	Kontrol	65.4444	65.4444
	P2		74.3333
	Sig.	.908	.056
Duncan ^a	P1	63.5556	
	P3	63.8889	
	Kontrol	65.4444	
	P2		74.3333
	Sig.	.542	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Means Plot



Pembahasan

Jaringan otak memiliki sel utama yaitu sel saraf (neuron) yang berfungsi untuk menyampaikan sinyal dari satu sel ke sel lainnya. Jaringan otak sangat peka terhadap berbagai cedera seperti trauma mekanik, ischemia, dan stres oksidatif [17]. Radikal bebas adalah penyebab stres oksidatif yang apabila terjadi secara berkepanjangan dapat merusak membran sel dan menyebabkan kematian sel, sehingga terjadi perubahan gambaran histologi contohnya pada organ otak. Penelitian ini mengamati bagian *cortex cerebri* dimana bagian tersebut didominasi oleh sel neuron.

Kerusakan membran sel dibagi menjadi 3 antara lain piknotik, karioreksis dan kariolisis. Piknotik umumnya perubahan lisis yang terjadi dalam jaringan nekrotik melibatkan sitoplasma sel, namun intilah yang paling jelas menunjukkan perubahan-perubahan kematian sel, biasanya inti sel yang mati akan menyebar, mengerut, memadat, batasnya tidak teratur. Selanjutnya yaitu karioreksis merupakan inti selnya *double* atau setengah, dapat hancur dan meninggalkan pecahan-pecahan kromatin yang tersebar didalam sel. Kemudian kariolisis intinya akan menghilang atau kosong [18].

Hasil pengamatan mikroskopis terhadap gambaran histopatologi otak menunjukkan perbedaan antara kontrol dan perlakuan. Kelompok Kontrol (K) menunjukkan adanya sel neuron normal dengan ukuran paling besar diantara sel lainnya dan memiliki inti. Kelompok perlakuan 1 (P1) menunjukkan adanya nekrosis pada sel yang mengalami piknosis, karioreksis, dan kariolisis yang diduga karena dosis yang diberikan terlalu sedikit yaitu 250 mg/KgBB. Kelompok perlakuan 2 (P2) menunjukkan adanya perbaikan yang sangat signifikan dengan berkurangnya nekrosis pada sel yang dipapar dosis paling efektif yaitu 500 mg/KgBB. Sedangkan kelompok perlakuan 3 (P3) juga menunjukkan adanya nekrosis pada sel yang mendekati perlakuan 1 (P1) yang diduga karena dosis terlalu tinggi yaitu 1000 mg/KgBB.

Gambaran histologi otak pada kelompok Kontrol (K) tanpa di papar EMSA terlihat sel neuron berbentuk bulat atau lonjong serta memiliki inti ditengahnya tapi masih terlihat nekrosis pada sel, hal ini bisa disebabkan karena makanan, usia, suhu, kelembaban dll.

Berbeda dengan (K), gambaran histopatologi kelompok perlakuan 1 (P1) yang merupakan kelompok perlakuan yang dipapar dosis EMSA 250 mg/KgBB, terlihat banyak sel neuron yang mengalami nekrosis ditandai dengan inti yang mengalami piknosis karioreksis, dan kariolisis serta hanya sedikit sel neuron. Nekrosis terjadi karena dosis yang dipaparkan terlalu sedikit dan disebabkan karena antioksidan dalam benalu teh menjadi berlebih menyebabkan prooksidan (radikal bebas) yang menyebabkan terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) sehingga terjadi stres oksidatif dan memicu peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid ini akan mengakibatkan terjadinya penurunan aktivitas pompa Natrium – Kalium, disregulasi volume sel, dan peningkatan kalsium secara intraseluler yang masif sehingga menyebabkan kematian sel (nekrosis) [19]. Nekrosis terjadi karena adanya kerusakan membran sel, lisosom yang mengeluarkan enzim ke sitoplasma dan menghancurkan sel, kemudian isi sel keluar karena kerusakan membran plasma.

Gambaran histopatologi otak pada perlakuan 2 (P2) menunjukkan adanya perbaikan yang cukup signifikan setelah diberikan paparan EMSA dengan dosis 500 mg/KgBB yang hanya ditemukan beberapa sel neuron yang mengalami nekrosis. Peningkatan dosis yang efektif ini terbukti menunjukkan perbaikan gambaran histopatologi otak yang semakin baik karena zat aktif yang terkandung dalam EMSA yaitu flavonoid dari kuersetin yang mengandung antioksidan dan dapat menghambat radikal bebas sehingga tidak membuat kerusakan pada sel salah satunya yaitu otak, sehingga kerusakan sel di otak dapat terhenti. Sel otak yang mengalami nekrosis kemudian difagositosis oleh makrofag dan digantikan dengan sel-sel baru, sehingga dapat memperbaiki gambaran histopatologi otak mendekati gambaran normal [20]. Sedangkan gambaran histopatologi otak pada perlakuan 3 (P3) tidak jauh beda dengan kontrol (K), karena banyak terjadi kerusakan sel (nekrosis) yang dapat diartikan bahwa dosis 1000 mg/KgBB dikatakan tidak efektif untuk organ otak tikus.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa pemberian EMSA (Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans) kepada tikus betina (*Rattus norvegicus*) setelah dilakukan uji Tes Duncan pada perlakuan P1, P3 dan kontrol nilainya tidak jauh berbeda dibandingkan dengan P2. Maka, dosis yang paling efektif untuk mencegah kerusakan sel (*nekrosis*) adalah dosis 500 mg/KgBB selama 90 hari (paparan subkronik) sehingga dapat diartikan pemberian EMSA tidak mengalami toksik terhadap tikus betina dikarenakan zat aktif yang terkandung dalam EMSA yaitu flavonoid dari kuersetin yang mengandung antioksidan dan dapat menghambat radikal bebas.

Terima Kasih

Kementrian Riset Dan Teknologi Pendidikan Tinggi (Kemenristek DIKTI) dengan surat perjanjian penelitian nomor: 020/SP2H/P/K7/KM/2016, tanggal 25 April 2016.

Daftar Pustaka

- [1] Bahar, N.W. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Dan Fraksi Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) Terhadap Gambaran Hematologi Pada Tikus Putih Laktasi. Skripsi Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- [2] Athiroh, N and Permatasari, N. 2012. Mechanism of Tea Mistletoe Action on Blood Vessels. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. **27** No.(1): 1-7.
- [3] Athiroh, N., Widodo, M.A., dan Widjajanto, E. 2000. *Efek Scurulla oortiana (Benalu Teh) dan Macrosolen javanus (Benalu Jambu Mawar) terhadap Kontraktilitas Pembuluh Darah Arteri Ekor Tikus Terpisah dengan atau tanpa Endotel*. [Thesis]. Universitas Brawijaya, Malang.
- [4] Athiroh, N. 2009. *Kontraktilitas Pembuluh Darah Arteri Tikus Terpisah dengan atau tanpa Endotel Setelah Pemberian Ekstrak Scurulla oortina (Benalu Teh)*. Jurnal Berkala Hayati Edisi Khusus D 3, 31-34.
- [5] Athiroh, N., and Sulistyowati, E. 2013. *Scurulla atropurpurea Increases Nitric Oxide and Decreases Malondialdehyde in Hypertensive Rats*. Jurnal Universa Medicina. 32 (1), 44-50.
- [6] Athiroh, N., Permatasari, N., Sargowo, D., and Widodo, M.A. 2014. *Effect of Scurulla atropurpurea on Nitric Oxide, Endothelial Damage, and Endothelial Progenitor Cells of DOCA-salt Hypertensive Rats*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 17 (8), 622
- [7] Athiroh, N., Permatasari, N., Sargowo, D., and Widodo, M.A. 2014. *Antioxidative and Blood Pressure-Lowering Effects of Scurulla atropurpurea on Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive Rats*. Biomarkers and Genomic Medicine 6 (1), 32-36.
- [8] Athiroh, N., and Sulistyowati, E. 2015. *Evaluation of Methanolic Extract of Scurulla atropurpurea (Bl.) Dans Sub-Chronic Exposure On Wistar Rat Liver*. American-Euroasian Network for Scientific Information Journal, 245-250.
- [9] Shofiyah, N., Athiroh, N., Santoso, H. 2016. *Kajian Subkronik Ekstrak Metanolik Scurulla atropurpurea (Bl.) Dans Terhadap Kadar Trigliserida Pada Tikus Wistar Betina*. e-Jurnal Ilmiah Biosainstropis 2(2):30-35.
- [10] Fatimah, H., Athiroh, N., Santoso, H. 2017. *Pemberian Ekstrak Metanolik Scurulla atropurpurea (Bl.) Dans Secara Subkronik Terhadap Protein Total dan Albumin Tikus Wistar Betina*. e-Jurnal Ilmiah Biosainstropis 2(2):49-54.
- [11] Indah, N., Athiroh, N., Santoso, H. 2017. *Pemberian Subkronik Ekstrak Metanolik Scurulla atropurpurea (Bl.) Dans Terhadap Kadar Kreatinin Tikus Wistar*. e-Jurnal Ilmiah Biosainstropis 2(2):42-48.
- [12] Hikmah, U., Athiroh, N., Santoso, H. 2017. *Kajian Subkronik Ekstrak Metanolik Scurulla atropurpurea (Bl.) Dans Terhadap Serum Glutamat Oxaloacetic Transminase (SGOT) Tikus Wistar*. e-Jurnal Ilmiah Biosainstropis 2(2):30-35.
- [13] Argus, M., Athiroh, N., Santoso, H. 2016. *Paparan 28 Hari Ekstrak Metanolik Scurulla atropurpurea (Bl.) Dans Terhadap Kadar SGPT Tikus Wistar Betina*. e-Jurnal Ilmiah Biosainstropis 2(1):53-58.
- [14] Athiroh, N., and Doti, W. 2017. *Study Of Superoxide Dismutase And Malondialdehyde Concentrations In Mice After Administration Of Methanolic Extract Of Scurulla atropurpurea (Bl.)*. Jurnal Kedokteran Hewan 11(1), 19-22.
- [15] BPOM. 2014. *Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara in vivo*. Jakarta, BPOM.

- [16] Ganong, F.W. 2002. *Buku Ajar Fisiologi*. Alih Bahasa M. Djauhari Widjaja Kusumah dkk. Jakarta: EGC.
- [17] Lee, A.L., Ogle, W.O. and Sapolsky, R.M. 2002. *Stress and Depression In The Central Nervous System*. *Glia* 30(2):105-121
- [18] Lu, F.C. 2010. *Toksikologi Dasar*. Jakarta: UI Press.
- [19] Arief, S. 2005. *Bagian SMF Ilmu Kesehatan Anak*. Fakultas Kedokteran Unair/RSU Dr. Soetomo. Surabaya
- [20] Pambudi, A, P. 2016. *Studi Pemberian Ekstrak Etanol Daun Blimbing Wuluh (Averhoa bilimbi L.,) Pada Hewan Coba Tikus (Rattus novergicus) Yang Di Induksi Sipermetrin Terhadap Gambaran Histopatologi Organ Otak Dan Profil Protein Serum*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang