

Artikel Penelitian

Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) serta Aktivitas Lokomotor Ikan Zebra (*Danio rerio*)

The Effect of Centella Asiatica's Extract towards the Expression of Tyrosine Hydroxylase (TH) and Locomotor Activity in Zebrafish (Danio rerio)

Syafira Hanum¹, Mochammad Aris W², Masruroh Rahayu³

¹Laboratorium Ilmu Bedah Saraf Rumah Sakit Umum Dr Saiful Anwar Malang

²Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

³Laboratorium Ilmu Bedah Saraf Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Beberapa faktor yang mungkin berpengaruh atau menjadi penyebab Parkinson adalah genetik dan lingkungan. Faktor lingkungan termasuk didalamnya adalah paparan dari organofosfat atau insektisida diduga merupakan salah satu faktor risiko terjadinya berbagai penyakit neurodegeneratif antara lain Alzheimer, Parkinson, *Multiple sclerosis*. Rotenone dapat masuk ke jaringan dan merusak *dopaminergic synapses* pada substansia nigra (SN) *pars compacta* dan jalur nigrostriatal sehingga akan menyebabkan penurunan pada kadar dopamin dan akan berpengaruh pada aktivitas lokomotor. Pengobatan Parkinson bertujuan untuk mencegah kematian neuron *dopaminergic*. Pegagan mempunyai efek sebagai antioksidan dan antiinflamasi mampu mencegah stres oksidatif serta membersihkan radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) berbagai dosis dalam memperbaiki aktivitas lokomotor dan menurunkan ekspresi Tirosin hidroksilase (TH) di otak ikan zebra (*Danio rerio*). Ikan zebra yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan yang dipapar rotenone dan diberikan perlakuan ekstrak pegagan masing-masing dosis 2,5µg/ml, 5µg/ml, dan 10µg/ml. Setiap kelompok terdiri dari 5 ikan zebra. Pada setiap kelompok dilakukan pengukuran aktivitas lokomotor ikan zebra pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28. Selain itu juga dilakukan penghitungan ekspresi Tirosin hidroksilase (TH) dengan menggunakan teknik imunohistokimia dari jaringan otak ikan zebra pada setiap kelompok di hari ke-28. Terbukti bahwa ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dapat memperbaiki aktivitas lokomotor dan meningkatkan ekspresi Tirosin hidroksilase di otak ikan zebra (*Danio rerio*).

Kata Kunci: *Centella asiatica*, aktivitas lokomotor, tirosin hidroksilase, rotenone

ABSTRACT

Some factors that may affect or cause Parkinson's disease are genetic and environmental factors including the exposure of organophosphates or insecticide that is suspected as one of the risk factors of various neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, and Multiple sclerosis. Rotenone can enter the network and damage dopaminergic synapses in the substantia nigra (SN) pars compacta and nigrostriatal pathway that will lead to a decrease in dopamine levels and will have an effect on locomotor activity. Parkinson treatment aimed to prevent neuron dopaminergic death. Pegagan has an effect as antioxidant and antiinflammation that can prevent oxidative stress and clean free radical. This study is aimed to examine the effect of Centella asiatica extracts in various doses in improving locomotor activity and decrease the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the brain of zebrafish (Danio rerio). Zebrafish were divided into 5 groups: negative control group, positive control group, treatment groups exposed to rotenone and Centella asiatica extract for dose of 2,5µg/ml, 5µg/ml, and 10µg/ml. Each group consisted of 5 zebra fish. The locomotor activity in each group was measured on day 0, 7, 14, 21, and 28. Tyrosine hydroxylase (TH) expression was calculated using immunohistochemical technique of zebrafish brain tissue in each group on day 28. Proved that the extract of Centella asiatica (Centella asiatica) can improve locomotor activity and increase the expression of tyrosine hydroxylase in the brain of zebrafish (Danio rerio).

Keywords: *Centella asiatica*, locomotor activity, tyrosine hydroxylase, rotenone

PENDAHULUAN

Penyakit Parkinson atau *Parkinson disease* (PD) merupakan salah satu penyakit neurodegeneratif tersering kedua setelah demensia Alzheimer (1). Beberapa faktor yang mungkin berpengaruh atau menjadi penyebab Parkinson adalah genetik dan lingkungan (2). Rotenone diketahui dapat menyebabkan terjadinya gejala penyakit Parkinson pada binatang coba dan telah diakui sebagai bahan penginduksi model penyakit Parkinson (3,4). Rotenone dapat masuk ke jaringan dan merusak *dopaminergic synapses* pada substansia nigra (SN) pars *compacta* dan jalur nigrostriatal sehingga akan menyebabkan penurunan pada kadar dopamin dan akan berpengaruh pada aktivitas lokomotor (5). Apabila rotenone masuk ke dalam sel akan menyebabkan disfungsi mitokondria kompleks I dan terbentuk stres oksidatif yang dapat menghambat kerja dari enzim tirosin hidroksilase sehingga kadar atau jumlah dopamin yang dihasilkan di celah sinap akan berkurang sehingga mempengaruhi aktivitas lokomotor (5).

Pegagan (*C. asiatica*) adalah tanaman herbal yang banyak digunakan untuk pengobatan dan juga untuk meningkatkan memori. Beberapa penelitian menunjukkan ekstrak dari tanaman ini memiliki efek *nootropic*, melindungi otak dari kerusakan yang diakibatkan peningkatan usia, meinginduksi pertumbuhan sel sel neuron dan juga mempunyai efek sebagai antioksidan dan antiinflamasi mampu mencegah stres oksidatif serta membersihkan radikal bebas (3,5).

Ikan zebra (*Danio rerio*) merupakan salah satu model coba standar yang dapat digunakan banyak penelitian, salah satunya untuk penelitian penyakit-penyakit neurodegenerative (6). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) serta aktivitas lokomotor dari ikan zebra yang dipapar dengan rotenone.

METODE

Desain Penelitian

Penelitian eksperimental laboratorik ini menggunakan ikan zebra yang dibagi kedalam 5 kelompok penelitian: 1) kontrol negatif yang tidak dipapar rotenone dan tidak diberi perlakuan ekstrak pegagan, 2) kontrol positif yang dipapar rotenone tetapi tidak diberi perlakuan ekstrak pegagan, 3) perlakuan 1 yang dipapar rotenone dan diberi perlakuan ekstrak pegagan dosis 2,5µg/mL, 4) perlakuan 2 yang dipapar rotenone dan diberi perlakuan ekstrak pegagan dosis 5µg/mL, dan 5) perlakuan 3 yang dipapar rotenone dan diberi perlakuan ekstrak pegagan dosis 10µg/mL. Setiap kelompok terdiri dari 5 ikan zebra. Pada setiap kelompok dilakukan pengukuran aktivitas lokomotor ikan zebra pada hari ke- 0, 7, 14, 21, dan 28. Selain itu juga dilakukan penghitungan rata-rata ekspresi *caspase 3* dengan menggunakan teknik imunohistokimia dari jaringan otak ikan zebra pada tiap-tiap kelompok di hari ke-28.

Ekstraksi Pegagan

Bagian daun dan batang pegagan yang berada di atas tanah dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C. Pegagan kemudian dihaluskan, direndam dengan *methanol*, dan didiamkan semalam sampai mengendap. Proses perendaman ini dilakukan sampai 3 kali lalu

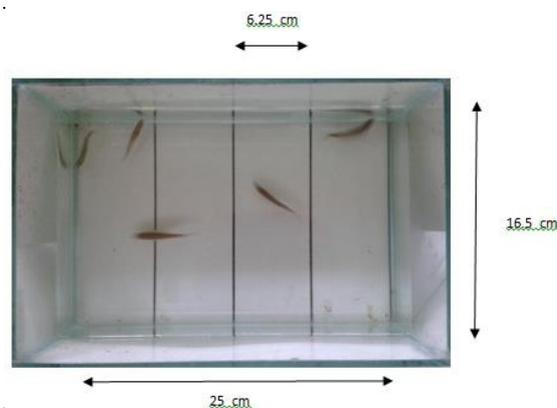
dilanjutkan dengan proses evaporasi. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol. Berdasarkan studi pendahuluan, diberikan ekstrak pegagan dalam 3 dosis 2,5µg/mL, 5µg/mL, dan 10µg/mL.

Pembuatan Larutan Rotenone (Sigma)

Rotenone sebanyak 20 mg dilarutkan dalam 1 mL DMSO (*dimethyl sulfoxide*). Dilakukan pengenceran untuk pembuatan larutan stok 2x10⁵ µg/L: diambil larutan rotenone dari stok 2x10⁷µg/L sebanyak 10 µl ditambah aquades sebanyak 990µL (kadar DMSO 1%); sehingga untuk mendapatkan konsentrasi 5µg/L dilakukan pemberian rotenone dari stok 2x10⁵µg/L sebanyak 50µL (konsentrasi DMSO 0,25 ppm) ke dalam aquarium 2L dan diganti setiap 2 hari.

Penghitungan Aktivitas Locomotor Ikan Zebra

Aktivitas lokomotor ikan zebra dewasa dinilai di dalam suatu tempat penampungan (panjang x lebar x tinggi: 25 x 16,5 x 6,5cm). Tiga garis vertikal digambarkan pada tempat penampungan dengan jarak yang sama sehingga akan membagi tempat penampungan menjadi empat zona (panjang dari masing-masing zona adalah 6,25cm). Aktivitas lokomotor diukur selama 5 menit dengan menghitung jumlah garis yang dilewati oleh ikan zebra dewasa. Aktivitas lokomotor dihitung dengan menjumlahkan garis-garis yang dilewati oleh ikan zebra, dibagi dengan waktu, dan diekspresikan dalam satuan jumlah garis yang dilewati tiap 5 menit. Ikan zebra dewasa memiliki panjang sekitar 5cm dan jarak di antara garis-garis vertikal adalah 6,25cm, maka penghitungan garis-garis vertikal yang dilewati memiliki sensitifitas yang cukup untuk mendeteksi pergerakan ikan zebra (7).



Gambar 1. Tempat penghitungan aktivitas lokomotor ikan zebra

Pengambilan Organ Otak Ikan Zebra

Ikan zebra ditempelkan pada *ice pack* untuk menimbulkan efek anestesi dan tidak menyakiti hewan coba. Dilakukan pembedahan dan diambil organ otaknya. Otak yang telah diambil diberi formalin. Untuk pemeriksaan imunohistokimia, organ otak segera disimpan pada suhu -20°C.

Pemeriksaan Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) dengan Teknik Imunohistokimia

Slide yang sudah mengalami proses deparafine siap untuk

dilakukan pemeriksaan imunohistokimia (*immunohistochemistry/IHC*). Primer Antibodi yang digunakan Tirosin Hidroksilase (TH). Ekspresi dari TH diobservasi dari bagian midbrain dari otak zebrafish. Dari slide yang telah jadi selanjutnya dilakukan penghitungan sel dengan menggunakan mikroskop cahaya sebanyak 10 lapang pandang dengan pembesaran 40x. Sel yang positif menunjukkan sitoplasma yang terwarnai coklat (8).

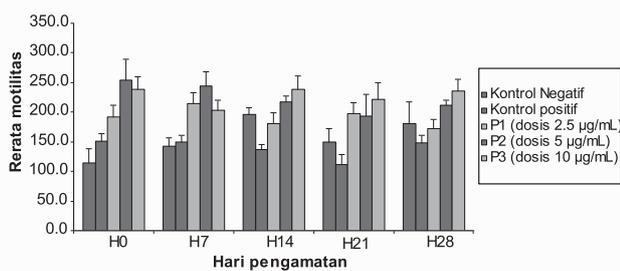
Analisis Statistik

Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *one-way ANOVA*, dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test*. Hasil uji statistik dianggap bermakna secara statistik bila $p < 0,05$.

HASIL

Aktivitas Lokomotor Ikan Zebra

Hasil uji *Anova* menunjukkan nilai rata-rata aktivitas lokomotor seluruh kelompok perlakuan pada hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28 berbeda secara signifikan ($p < 0,01$). Hasil uji *post hoc Tukey* terhadap kelompok K(-) dan K(+) menunjukkan bahwa pada hari ke-0 dan 7 rata-rata aktivitas lokomotor ikan zebra kelompok K(-) lebih rendah dibandingkan kelompok K(+) namun tidak berbeda signifikan ($p = 0,152$; $p = 0,969$), sedangkan pada hari ke-14 rata-rata aktivitas lokomotor ikan zebra kelompok K(-) lebih tinggi secara signifikan ($p < 0,001$), namun tidak pada hari ke 21 ($p = 182$) dan ke 28 ($p = 129$). Hasil uji *post hoc Tukey* terhadap kelompok K(+), P1, P2 dan P3 menunjukkan bahwa pada hari ke-7, 14 dan 21 rata-rata aktivitas lokomotor P1, P2 dan P3 berbeda signifikan dibandingkan kelompok K(+) (P1 ($p < 0,001$; $p = 0,002$; $p < 0,001$), P2 ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,001$), P3 ($p = 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$), sedangkan pada hari ke-0 dan 28 aktivitas lokomotor hanya kelompok P2 dan P3 berbeda signifikan dibanding kelompok K(+) ($p < 0,01$) dan tidak signifikan pada kelompok P1 dibanding K(+) ($p = 0,085$; $p = 0,373$) (Gambar 1).



Gambar 1. Rata-rata aktivitas lokomotor ikan zebra seluruh kelompok

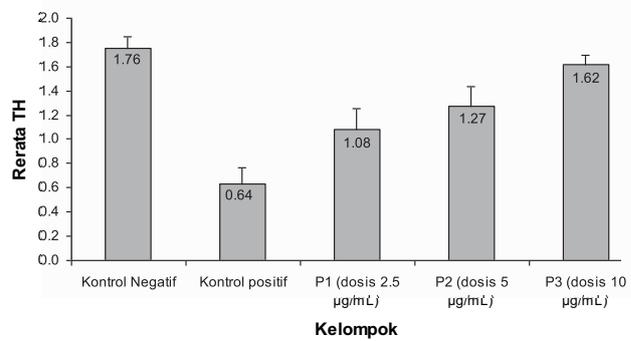
Hasil uji *post hoc Tukey* terhadap kelompok K(-) dan K(+) menunjukkan bahwa rotenone dapat menyebabkan penurunan aktivitas lokomotor ikan zebra secara signifikan sejak hari ke-14 pengamatan. Hasil uji *post hoc Tukey* terhadap kelompok K(+), P1, P2 dan P3 menunjukkan bahwa ekstrak pegagan dapat menyebabkan peningkatan aktivitas lokomotor ikan zebra secara signifikan.

Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) Otak Ikan Zebra

Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada ke-5 kelompok ($p < 0,05$), dimana TH pada

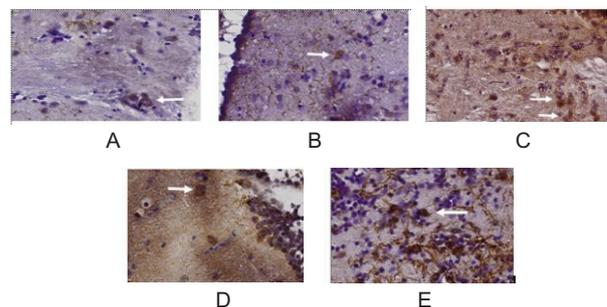
kelompok K (+) berbeda dengan kelompok K (-), P1, P2 dan P3 ($p < 0,01$). Perbandingan TH pada kelompok K (-) berbeda dengan kelompok K (+), P1, P2 dan P3 ($p < 0,001$; $p = 0,011$). Perbandingan TH pada kelompok P1 berbeda dengan kelompok K (+), K (-), P2 dan P3 ($p < 0,01$). Perbandingan TH pada kelompok P2 berbeda dengan kelompok K (+), K (-), P1 dan P3 ($p < 0,01$). Perbandingan TH pada kelompok P3 berbeda dengan kelompok K (+), K (-), P2 dan P1 ($p < 0,01$) (Gambar 2).

Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi TH otak ikan zebra menunjukkan bahwa paparan rotenone pada kelompok K(+) dapat menyebabkan penurunan rata-rata ekspresi TH dibandingkan kelompok K(-). Selain itu pemberian ekstrak pegagan dengan berbagai dosis dapat menyebabkan peningkatan rata-rata ekspresi TH pada kelompok P1, P2 dan P3 dibandingkan kelompok K(+) di mana semakin tinggi dosis ekstrak pegagan yang diberikan akan semakin meningkatkan rata-rata ekspresi TH hingga nilai yang tidak berbeda signifikan dibanding kelompok K(-) (Gambar 3).



Gambar 2. Rata-rata ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) otak ikan zebra seluruh kelompok

Hasil uji *post hoc Tukey* menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi TH kelompok K(-), P1, P2 dan P3 lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kelompok K(+) ($p < 0,05$).



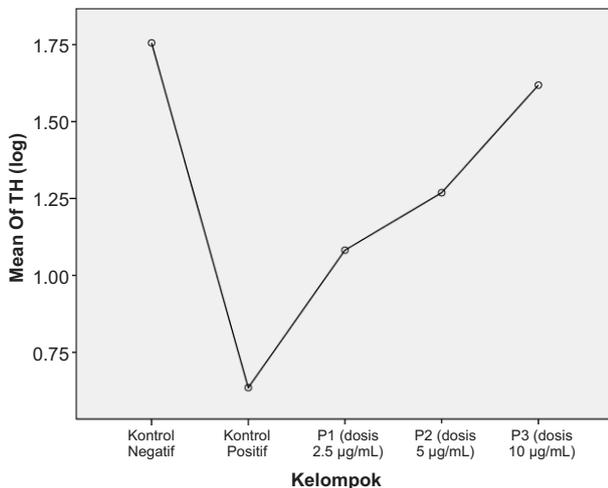
Gambar 3. Ekspresi Tirosin hidroksilase (TH) otak ikan zebra dengan teknik imunohistokimia dari seluruh kelompok

Keterangan:

- A : Ekspresi TH (→ warna coklat) pada kelompok kontrol (-)/ ikan zebra yang tidak dipapar rotenone.
- B : Ekspresi TH (→ warna coklat) pada kelompok kontrol (+)/ ikan zebra yang dipapar rotenone tanpa diberi pegagan.
- C : Ekspresi TH (→ warna coklat) pada kelompok P1/ ikan zebra yang dipapar rotenone dan diberi pegagan dosis 2,5µg/mL.
- D : Ekspresi TH (→ warna coklat) pada kelompok P2/ ikan zebra yang dipapar rotenone dan diberi pegagan dosis 5µg/mL.
- E : Ekspresi TH (→ warna coklat) pada kelompok P3/ ikan zebra yang dipapar rotenone dan diberi pegagan dosis 10µg/mL •

Uji Korelasi antara Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) Otak Ikan Zebra Hari ke-28 dan Dosis Ekstrak Pegagan

Berdasarkan hasil uji korelasi menunjukkan nilai koefisien korelasi antara TH otak ikan zebra hari ke-28 dan dosis ekstrak daun pegagan sebesar 0,959, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara TH dan dosis ekstrak daun pegagan. Dengan kata lain, semakin tinggi dosis ekstrak daun pegagan maka akan diikuti oleh peningkatan TH. Demikian sebaliknya, semakin rendah dosis ekstrak daun pegagan maka akan diikuti oleh TH yang lebih rendah (Gambar 4).



Gambar 4. Grafik plots ekspresi TH otak ikan zebra hari ke-28 dan dosis ekstrak pegagan

Semakin tinggi dosis ekstrak daun pegagan maka akan diikuti oleh peningkatan TH. Demikian sebaliknya, semakin rendah dosis ekstrak daun pegagan maka akan diikuti oleh TH yang lebih rendah.

DISKUSI

Pengobatan yang diberikan pada pasien dengan kasus Parkinson hanyalah bersifat mengurangi gejala agar tidak menjadi bertambah parah, atau bersifat simptomatis, sehingga tidak dapat mencegah terjadinya proses degenerasi pada neuron dopaminergik (9). Mekanisme molekular awal pada penyakit Parkinson yang terjadi adalah kematian sel neuron yang disebabkan oleh stres oksidatif, toksin, defek-defek di dalam mitokondria kompleks I, dan agregasi protein yang semuanya itu ditandai dengan hilangnya neuron dopaminergik yang berlangsung secara progresif (10). Maka dari itu diperlukan penelitian obat baru yang dikhususkan untuk mencegah serta melindungi sel neuron dari kerusakan. Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan fitofarmaka yang memiliki efek neuroprotektan serta dapat mengurangi oksidatif stres (11). Pada beberapa penelitian pendahulu telah terbukti bahwa kandungan yang terdapat pada ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dapat bersifat neuroprotektan terhadap neuron dopaminergik yang telah dipapar dengan MPTP (12).

Dalam penelitian ini dilakukan uji efektivitas ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) untuk mengetahui efeknya dalam memperbaiki aktivitas lokomotor ikan zebra dan

meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase pada otak ikan zebra yang telah dipapar dengan rotenone. Rotenone sendiri telah terbukti selektif merusak neuron dopaminergik sehingga menyebabkan klinis gangguan gerak dan gejala penyakit Parkinson lainnya termasuk Lewy (13). Dalam penelitian ini menggunakan 25 ekor ikan zebra yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan, kemudian diamati aktivitas lokomotornya pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28 untuk mengetahui progresifitas gejala.

Dari hasil pengamatan diketahui rotenone dapat menyebabkan terjadinya penurunan dari aktivitas lokomotor yang terjadi progresif, sehingga menyebabkan peningkatan rigiditas menjadi sangat signifikan biasanya pada akhir minggu ketiga dan akan menurun secara drastis pada minggu kelima. Pada minggu keempat dan kelima akan terjadi penurunan kadar neurotransmitter dopamin yang sangat signifikan, sekitar 82% di daerah regio mesensefalon (13). Pada beberapa penelitian sebelumnya juga menyebutkan bahwa terjadi perubahan yang signifikan terhadap aktivitas lokomotor dan penurunan perilaku depresi pada kelompok tikus yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) (14).

Penelitian yang dilakukan oleh Testa *et al* pada tahun 2005 telah membuktikan dengan paparan rotenone subakut dapat menyebabkan kerusakan yang selektif pada neuron dopaminergik dan agregasi α -synuclein. Pada paparan rotenone kronik, juga menyebabkan kerusakan pada substansia nigra pars kompakta, perubahan morfologi, dan penurunan enzim tirosin hidroksilase (TH) (15). Pada hasil penelitian ini, dari hasil uji ANOVA yang dilanjutkan dengan *post hoc test* (Tukey HSD test) untuk ekspresi tirosin hidroksilase (TH) otak ikan zebra didapatkan nilai koefisien korelasi antara ekspresi tirosin hidroksilase (TH) otak ikan zebra dan dosis ekstrak pegagan sebesar 0,959 dengan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,005$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara TH dan dosis ekstrak pegagan. Dengan kata lain, semakin tinggi dosis ekstrak pegagan maka akan diikuti oleh peningkatan TH. Demikian sebaliknya, semakin rendah dosis ekstrak pegagan maka akan diikuti oleh TH yang lebih rendah.

Pada penelitian ini ditemukan beberapa keterbatasan dari peneliti yang berkaitan dengan proses pembuatan slide histopatologi otak ikan zebra yang memiliki tingkat kesulitan yang cukup tinggi dan proses perhitungan aktivitas lokomotor baik dari faktor psikologis ikan zebra ataupun dari kondisi laboratorium. Maka dari itu, saran untuk menanggulangi hal tersebut, diperlukan adanya metode khusus untuk menghitung aktivitas lokomotor yang lebih obyektif dengan menggunakan alat khusus, serta membuat kondisi yang ideal pada laboratorium sehingga dapat mendukung agar memperoleh hasil yang akurat ditunjang dengan ketersediaan alat-alat laboratorium yang modern serta sumber daya manusia di bidang histopatologi yang kompeten sehingga dapat mendukung penelitian di bidang kedokteran molekuler.

Pada penelitian ini telah dibuktikan bahwa ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dapat memperbaiki aktivitas lokomotor, dengan dosis yang paling efektif adalah 5 µg/ml. Ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) juga dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase di otak ikan zebra, dosis yang paling efektif adalah 10 µg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ottley RG, Agbontaen JX, and Fodstad H. *Tailoring Treatment for the Parkinson's Disease Patient*. Journal of the American Academy of Physician Assistants. 1999; 12(3): 54-56, 59-60, 63-66.
2. Henchcliffe C. *An Update on Parkinson's Disease*. Minneapolis: The American Academy of Neurology Institute; 2012.
3. Khotimah H, Riawan W, Kalsum U, Widodo MA, and Kishida M. *Neuroprotective Effect of Pegagan Leaf (CeA): Induction of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Production, TNF α , BCL2 Expression and Apoptosis on Rat Pup Neuronal Cells in Vitro*. (Online) 2014. <http://herbalnet.healthrepository.org>
4. Cicchetti F, Droulin-Ouller J, and Gross RE. *Environmental Toxins and Parkinson's Disease: What Have We Learned from Pesticide-Induced Animal Models?* Trends in Pharmacological Sciences. 2009; 30(9): 475-483.
5. Kishida M and Callard GV. *Distinct Cytochrome P450 Aromatase Isoforms in Zebrafish (Danio rerio) Brain and Ovary are Differentially Programmed and Estrogen Regulated during Early Development*. Endocrinology. 2001; 142(2): 740-750.
6. Orhan IE. *Centella asiatica (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012; 2012: 8.
7. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, and Greenamyre JT. *Chronic Systemic Pesticide Exposure Reproduces Features of Parkinson's Disease*. Nature Neuroscience. 2000; 3(12): 1301-1306.
8. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, et al. *Caspase-3: A Vulnerability Factor and Final Effector in Apoptotic Death of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000; 97(6): 2875-2880.
9. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek APM, and Woutersent RA. *Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish*. Toxicologic Pathology. 2011; 39(5): 759-775
10. Dauer W, Przedborski S. *Parkinson's Disease: Mechanisms and Models*. Neuron. 2003; 39(6): 889-909.
11. Ling, N. *Rotenone-A Review of Its Toxicity and Use for Fisheries Management*. Science for Conservation 211. New Zealand: Department of Conservation; 2003; pp. 40.
12. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Taylor G, Sherer T, and Greenamyre JT. *Rotenone Model of Parkinson Disease: Multiple Brain Mitochondria Dysfunctions after Short Term Systemic Rotenone Intoxication*. Journal of Biological Chemistry. 2005; 280(51): 42026-42035.
13. Sharma N and Nehru B. *Beneficial of Vitamin E in Rotenone Induced Model of PD: Behavioural, Neurochemical and Biochemical Study*. Experimental Neurobiology. 2013; 22(3): 214-223.
14. Kumar V, Aakanksha T, Singh BK, Nagarajan K, Machawal L, and Bajaj UK. *Attenuating Depression Behavior by Centella Asiatica Extract & Venlafaxine in Mice Induced through Forced Swim and Tail Suspension Test*. International Journal of Pharmacology and Toxicology. 2013; 1(2): 29-35.
15. Testa CM, Sherer TB, and Greenamyre JT. *Rotenone Induces Oxidative Stress and Dopaminergic Neuron Damage in Organotypic Substantia Nigra Cultures*. Molecular Brain Research. 2005; 134(1): 109-118.