

SKRIPSI

**EFEK PAPARAN SODIUM FLUORIDA TERHADAP
PERILAKU TERKAIT FUNGSI KOGNITIF
DAN RESEPTOR NMDA PADA
MENCIT (*Mus musculus*)**



HAFIZAH KHAIRIN

04011182025038

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

2023

SKRIPSI

**EFEK PAPARAN SODIUM FLUORIDA TERHADAP
PERILAKU TERKAIT FUNGSI KOGNITIF
DAN RESEPTOR NMDA PADA
MENCIT (*Mus musculus*)**

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran (S.Ked)**



Oleh:

HAFIZAH KHAIRIN

04011182025038

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2023**

HALAMAN PENGESAHAN
EFEK PAPARAN SODIUM FLUORIDA TERHADAP
PERILAKU TERKAIT FUNGSI KOGNITIF
DAN RESEPTOR NMDA PADA MENCIT (*Mus musculus*)

LAPORAN AKHIR SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran di Universitas Sriwijaya

Oleh:
Hafizah Khairin
04011182025038

Palembang, 27 Desember 2023
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

Pembimbing I
Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M. Biomed
NIP. 198901122020122009



Pembimbing II
dr. Eka Febri Zulissetiana, M.Bmd
NIP. 198802192010122001



Penguji I
dr. Rini Nindela, SpN, M. Kes
NIP. 198607212010122010



Penguji II
dr. Budi Santoso, M.Kes
NIP. 198410162014041003



Mengetahui,
Koordinator Program Studi
Pendidikan Dokter



dr.Susilawati, M.Kes
NIP. 197802272010122001

Wakil Dekan I
Fakultas Kedokteran



Prof. Dr. Ariannuddin, SpKO, MPd.Ked.
NIP. 197306151999031001

HALAMAN PERSETUJUAN

Karya tulis ilmiah berupa laporan akhir skripsi ini dengan judul “Efek paparan sodium fluorida terhadap perilaku terkait fungsi kognitif dan reseptor nmda pada mencit (*mus musculus*)” telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya pada tanggal 27 Desember 2023

Palembang
Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah berupa Laporan Akhir Skripsi

Pembimbing I
Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M. Biomed
NIP. 198901122020122009



Pembimbing II
dr. Eka Febri Zulissetiana, M.Bmd
NIP. 198802192010122001



Penguji I
dr. Rini Nindela, SpN, M. Kes
NIP. 198607212010122010



Penguji II
dr. Budi Santoso, M.Kes
NIP. 198410162014041003



Mengetahui,
Koordinator Program Studi
Pendidikan Dokter



dr.Susilawati, M.Kes
NIP. 197802272010122001

Wakil Dekan I
Fakultas Kedokteran



Prof. Dr. Dr. Ir. H. Annuddin, SpKO, MPd.Ked.
NIP. 197306011999031001



HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Hafizah Khairin

NIM : 04011182025038

Judul : Efek Paparan Sodium Fluorida Terhadap Perilaku Terkait Fungsi Kognitif Dan Reseptor Nmda Pada Mencit (*Mus Musculus*)

Menyatakan bahwa skripsi saya merupakan hasil karya saya sendiri didampingi tim pembimbing dan tim penguji, dan bukan hasil jiplakan/plagiasi. Apabila ditemukan unsur jiplakan/plagiasi dan skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik dari Universitas Sriwijaya sesuai aturan yang berlaku.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.



Palembang, 27 Desember 2023

Hafizah Khairin

ABSTRAK

EFEK PAPARAN SODIUM FLUORIDA TERHADAP PERILAKU TERKAIT FUNGSI KOGNITIF DAN RESEPTOR NMDA

PADA MENCIT (*Mus musculus*)

(Hafizah Khairin, Desember 2023, 80 halaman)

Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

Latar Belakang: Fluorida merupakan salah satu mineral yang jumlahnya melimpah di alam. WHO telah menyatakan adanya daerah endemis fluorosis akibat konsumsi jumlah fluorida yang berlebihan. Penelitian terdahulu telah mengungkapkan bahwa fluorida memiliki efek neurotoksisitas dan mengganggu fungsi kognitif pada domain memori. Pembentukan memori erat kaitannya dengan glutamat dan reseptornya yang terdiri dari NMDA dan AMPA. Studi ini bertujuan untuk mengetahui efek paparan sodium fluorida pada perilaku terkait fungsi kognitif dan reseptor NMDA pada mencit.

Metode: Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vivo* dengan pendekatan *posttest only control group*. Tiga puluh dua ekor mencit galur C57BL/6 usia 70 minggu dibagi ke dalam empat kelompok perlakuan dosis Sodium Fluorida (NaF): kelompok kontrol (NaF 0 mg/L), kelompok NaF 1 (2,5 mg/L), kelompok NaF 2 (5 mg/L), dan kelompok NaF 3 (10 mg/L). Tikus diinduksi NaF selama 8 minggu perlakuan. Setelah perlakuan pemberian NaF, mencit dilakukan uji OLT dan ORT untuk melihat rasio diskriminasi yang akan diinterpretasikan pada perilaku terkait fungsi kognitif. Setelah dilakukan uji OLT dan ORT, mencit didekapitasi dan diambil hipokampus untuk diperiksa kadar protein subunit NMDAR, yaitu Grin2a menggunakan *western blot*.

Hasil: Setiap kelompok pemberian NaF memiliki hasil rasio diskriminasi OLT dan ORT lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. (Bonferroni test: $p < 0,001$ - $p = 0,003$) Akan tetapi, setiap kelompok dosis NaF tidak memiliki perbedaan signifikan (Bonferroni test: $p > 0,05$). Pemeriksaan protein subunit Grin2a masih dalam tahap pengerjaan, karena proses optimasi awal yang belum berhasil dilakukan.

Kesimpulan: Paparan fluorida dengan dosis (2,5-10) berpengaruh pada penurunan fungsi kognitif.

Kata Kunci: *Sodium Fluorida, Fungsi Kognitif, OLT, ORT, Reseptor NMDA.*

ABSTRACT

**THE EFFECTS OF SODIUM FLUORIDE EXPOSURE
ON MICE's (Mus musculus) COGNITIVE FUNCTION-RELATED
BEHAVIORS AND NMDA RECEPTORS
(Hafizah Khairin, December 2023, 80 pages)
Faculty of Medicine, Sriwijaya University**

Background: Fluoride is one of the minerals that are abundant in nature. WHO has declared the existence of fluorosis endemic areas due to excessive consumption. Fluoride has a neurotoxicity effect and impaired the cognitive function in memory domain. Memory formation is closely related to glutamate and its receptors (NMDA and AMPA). This study aimed to determine the effect of sodium fluoride exposure on cognitive function-related behavior and NMDA receptors.

Method: This study was an invivo experimental study with a posttest only control group design. Thirty-two C57BL/6 strain mice aged 70 weeks were divided into four groups of Sodium Fluoride (NaF) doses: NaF group 1 (2.5 mg/L), NaF group 2 (5 mg/L), and NaF group 3 (10 mg/L), and one control group (NaF 0 mg/L). Mice were induced NaF for 8 weeks. After exposure, mice were tested for OLT and ORT to observe the ratio of discrimination on cognitive function-related behaviors. Then, mice were decapitated and hippocampus was analyzed to measure NMDAR subunit protein: Grin2a with western blot method.

Results: Each NaF group had a lower OLT and ORT discrimination ratio compared to the control group (Bonferroni test: $p < 0,001$ - $p = 0,003$). However, there were not significant differences between NaF doses groups (All of Bonferroni test: $p > 0,05$). The examination of Grin2a subunit proteins is still in progress, due to the unsuccessful optimization process yet.

Conclusions: Exposure to fluoride at doses (2.5-10) has an effect on cognitive function decline.

Keywords: sodium fluoride, cognitive function, OLT, ORT, NMDA receptor.

RINGKASAN

EFEK PAPARAN SODIUM FLUORIDA TERHADAP PERILAKU TERKAIT FUNGSI KOGNITIF DAN RESEPTOR NMDA PADA MENCIT (*Mus musculus*)
Karya Tulis Ilmiah berupa Skripsi, 27 Desember 2023

Hafizah Khairin; Supervised by Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M. Biomed and dr. Eka Febri Zulissetiana, M. Biomed

Medical Education Study Program, Faculty of Medicine, Sriwijaya University.

XVIII + 80 pages, 8 tables, 16 figures, 4 appendices

Fluorida adalah salah satu mineral yang berlimpah di alam. Organisasi Kesehatan Dunia telah menyatakan bahwa Indonesia adalah salah satu daerah endemis fluorosis, karena konsumsinya yang berlebihan. Penelitian sebelumnya telah membahas bahwa fluoride memiliki efek neurotoksisitas pada gangguan fungsi kognitif dalam domain memori. Selain itu, dihipotesiskan bahwa pembentukan memori terkait dengan glutamat dan reseptor yang terdiri dari NMDA dan AMPA.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh paparan natrium fluorida terhadap perilaku terkait fungsi kognitif dan reseptor NMDA pada tikus. Ini adalah studi eksperimental *invivo* dengan pendekatan *posttest only control group*. Tiga puluh dua tikus (*Mus musculus*) strain C57BL / 6 berusia 70 minggu dibagi menjadi empat kelompok. Tiga kelompok menerima dosis Sodium Fluoride (NaF): kelompok NaF 1 (2,5 mg / L), kelompok NaF 2 (5 mg / L), dan kelompok NaF 3 (10 mg / L), sementara satu kelompok sebagai kontrol (NaF 0 mg / L), tikus telah diinduksi NaF selama 8 minggu intervensi. Setelah terpapar NaF, tikus tikus menjalani tes OLT dan ORT untuk melihat rasio diskriminasi perilaku yang berkaitan dengan fungsi kognitif. Setelah itu, tikus didekapitasi untuk mendapatkan hippocampus mereka. Hippocampus diisolasi untuk pengukuran kadar protein subunit reseptor NMDA (Grin2a) dengan metode western blot.

Hasil pengukuran OLT dan ORT menunjukkan rasio diskriminasi berikut: Kelompok NaF 2,5 mg / L (OLT = $-0,321 \pm 0,218$; ORT = $-0,110 \pm 0,224$), kelompok NaF 5 mg / L (OLT = $-0,441 \pm 0,208$; ORT = $0,077 \pm 0,283$), dan

kelompok NaF 10 mg / L (OLT = $-0,079 \pm 0,191$; ORT = $-0,175 \pm 0,282$), sedangkan kelompok kontrol (OLT = $0,445 \pm 0,311$; ORT = $0,717 \pm 0,115$). Hasil uji one-way ANOVA menunjukkan bahwa setiap kelompok pemberian NaF memiliki rasio diskriminasi yang berbeda (OLT: F3; 16 = 13.685. $p < 0.001$; ORT: F3; 16 = 14.850 = 14.850. $p < 0.001$). Tes tindak lanjut pasca-hoc Bonferroni menunjukkan bahwa ketiga kelompok yang diinduksi NaF memiliki nilai OLT dan ORT yang lebih rendah dibanding kontrol (OLT: $p < 0,001-0,003$; ORT: $hal < 0.001-0.018$). Sementara itu, setiap kelompok yang diinduksi NaF tidak memiliki nilai yang berbeda satu sama lain (OLT dan ORT; $p > 0,05$). Pengukuran kadar protein reseptor subunit NMDA dari Grin2a belum diperoleh, karena proses optimasi belum berhasil

Paparan fluoride dapat menimbulkan kerusakan di berbagai sel, termasuk di sel neuron. Fluoride memicu terjadi stres oksidatif, kerusakan langsung organela, dan apoptosis. Fluoride mampu menimbulkan kerusakan sel melalui berbagai mekanisme. Di dalam sel fluoride akan berikatan dengan hydrogen menjadi bentuk protonated hydrogen-fluoride (HF). Hal ini akan menimbulkan penurunan pH dan ketidakseimbangan elektrolit. Fluoride juga mengikat logam berat (metallo-fluoride). Ikatan logam berat secara langsung menimbulkan toksisitas pada sel. Logam berat mengganggu pengikatan berbagai rantai metabolisme didalam sel. Dampak dari gangguan ikatan tersebut telah menghambat sintesis protein, dan disrupsi organela. Fluorida juga meningkatkan produksi ROS di dalam sel sehingga mengakibatkan apoptosis yang dimediasi pada tiga jalur: yaitu jalur disfungsi mitokondria, disfungsi retikulum endoplasma, dan *death receptor*.

Paparan fluorida yang rendah dan tinggi sama-sama berpengaruh pada penurunan fungsi kognitif, namun saat ini belum diketahui efek paparan NaF terhadap kadar Grin2a di reseptor NMDA karena tahap optimasi belum berhasil dilakukan.

Kata Kunci: *Sodium Fluorida, Fungsi Kognitif, OLT, ORT, Reseptor NMDA*

SUMMARY

THE EFFECTS OF SODIUM FLUORIDE EXPOSURE ON MICE's (*Mus musculus*) COGNITIVE FUNCTION-RELATED BEHAVIORS AND NMDA RECEPTORS

Scientific Papers in the form of Thesis, December 27, 2023

Hafizah Khairin; Supervised by Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M. Biomed and dr. Eka Febri Zulissetiana, M. Biomed

Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya,

XVIII + 80 halaman, 8 tabel, 16 gambar, 4 lampiran

Fluoride is one of the minerals that are abundant in nature. World Health Organization has stated that Indonesia is the one of the fluorosis endemic areas, due to their excessive consumption. Previous research has discussed that fluoride has a neurotoxicity effect on impaired cognitive function in the memory domain. In addition, it is hypothesized that memory formation is related to glutamate and receptors consisting of NMDA and AMPA.

This study aimed to determine the effect of sodium fluoride exposure on cognitive function-related behavior and NMDA receptors in mice. This is an *invivo* experimental study with a posttest only control group approach. Thirty-two mice (*Mus musculus*) strain C57BL/6 aged 70 weeks were divided into four groups. Three groups received doses of Sodium Fluoride (NaF): NaF group 1 (2.5 mg/L), NaF group 2 (5 mg/L), and NaF group 3 (10 mg/L), while one group as a control (NaF 0 mg/L), rats had been induced NaF for 8 weeks of treatment. After exposure to NaF, mice have undergone OLT and ORT tests to see the ratio of behavioral discrimination related to cognitive function. After that, mice were decapitated to get their hippocampus. The hippocampus was isolated for measurement of NMDA receptor subunit protein (Grin2a) levels by the western blot method.

The OLT and ORT measurement results showed the following discrimination ratios: NaF group 2.5 mg/L (OLT=-0.321±0.218; ORT=-0.110±0.224), NaF group 5 mg/L (OLT=-0.441±0.208; ORT=0.077±0.283), and NaF group 10 mg/L (OLT=-0.079±0.191; ORT=-0.175±0.282), while the control group (OLT=0.445±0.311; ORT=0.717±0.115). The results of the one-way ANOVA test showed that each group administering NaF had a different discrimination ratio (OLT: $F_{3;16}=13.685, p<0.001$; ORT: $F_{3;16}=14.850, p<0.001$). Bonferroni's post-hoc follow-up tests showed that all three NaF-induced groups had lower OLT and ORT values than controls (OLT: $p<0.001-0.003$; ORT: $p<0.001-0.018$). Meanwhile, each NaF-induced group did not have different values from each other (OLT and ORT; $p>0.05$). Measurement of NMDA subunit receptor protein levels of the Grin2a has not been obtained, because the optimization process has not been successful.

Exposure to fluoride can cause damage in various cells, including neurons. Fluoride triggers oxidative stress, direct organ damage, and apoptosis. Fluoride is capable of inflicting cell damage through various mechanisms. Inside the cell fluoride will bind to hydrogen to form protonated hydrogen-fluoride (HF). This will lead to a decrease in pH and electrolyte imbalance. Fluoride also binds heavy metals (metalloid-fluoride). Heavy metal bonding directly causes toxicity to cells. Heavy metals interfere with the binding of various metabolic chains within cells. The impact of the bond disruption has inhibited protein synthesis, and organ disruption. Fluoride also increases ROS production within cells, resulting in apoptosis mediated in three pathways: mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum dysfunction, and death receptors.

Both of low and high fluoride exposure have an effect on cognitive function decline. However, the effect of NaF exposure on Grin2a levels at NMDA receptors has not been measured due to the optimization stage has not been successfully carried out.

Keywords: sodium fluoride, cognitive function, OLT, ORT, NMDA receptor

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil ‘alamin. Segala puji bagi Allaah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya kepada saya sehingga penulisan usulan penelitian skripsi yang berjudul “Efek Paparan Sodium Fluorida Terhadap Perilaku Terkait Fungsi Kognitif Dan Reseptor NMDA Pada Mencit (*Mus Musculus*)” ini dapat diselesaikan dan memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked) pada Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.

Penulisan usulan penelitian skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, dukungan, saran, serta segala bentuk bantuan yang diberikan kepada saya. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dosen pembimbing saya, Dr. dr. Siti Sarahdeaz Fazzaura Putri, M. Biomed. selaku pembimbing I dan dr. Eka Febri Zulissetiana selaku pembimbing II yang telah menyediakan waktunya untuk memberikan bimbingan, masukan, saran, serta motivasi dan semangat dalam menyelesaikan usulan penelitian skripsi ini.
2. Dosen penguji saya, dr. Rini Nindela SpN. M. Kes selaku penguji I dan dr. Budi Santoso, M.Kes selaku penguji II yang telah bersedia menguji dan memberikan koreksi, saran, dan masukan yang membangun sehingga skripsi ini jauh lebih baik.
3. dr. Evi Lusiana, M. Biomed. selaku ketua bagian Lab *Animal House* yang telah memberikan izin dan bimbingan dalam pengerjaan skripsi ini, dan

Suparman A.Md selaku pengurus Lab Animal House yang telah memberikan ilmu dan arahan kepada penulis tentang hewan penelitian serta membantu proses pengurusan dan pemberian perlakuan pada hewan penelitian.

4. Dosen dan Staf Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya yang telah memberikan bantuan selama proses Pendidikan.
5. Teman seperjuangan saya di Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Fakltas Kedokteran. Khususnya Putri, Tata, Riha, Uni, Aldi, Utari yang sama-sama menempuh edukasi di FK Universitas Sriwijaya ini
6. Ayahanda tercinta M. Irfanuddin, Ibunda tercinta Yunita Fediani, saudara-saudara saya, yaitu M. Fathan Mukhlisan dan Insyirah Ilmi, serta segenap keluarga yang telah memberikan segala upaya berupa do'a, dukungan moril dan material, dukungan emosional secara penyusunan skripsi ini.

Saya selaku penulis menyadari bahwa usulan penelitian skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan karena keterbatasan pengetahuan dan kemampuan. Oleh karena itu, saya sangat mengharapkan kritik dan saran demi pengembangan usulan penelitian yang lebih baik lagi. Saya berharap penelitian ini nantinya dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan.

Palembang, 27 Desember 2023



Hafizah Khairin

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Hipotesis Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
1.5.1 Manfaat Teoritis	4
1.5.2 Manfaat Kebijakan	5
1.5.3 Manfaat Masyarakat.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Fluorida	6
2.1.1 Definisi Fluorida	6
2.1.2 Sumber Fluorida.....	6
2.1.3 Kebijakan Fluorida pada Aspek Kesehatan.....	8
2.1.4 Efek Fluorida pada Manusia	9
2.2 Fungsi Kognitif	12

2.2.1	Definisi Fungsi Kognitif	12
2.2.2	Anatomi dan Fisiologi Fungsi Kognitif	12
2.2.3	Domain pada Fungsi Kognitif	14
2.2.4	Fisiologi Reseptor Glutamat pada Memori	19
2.2.5	Degenerasi Fungsi Kognitif pada Penuaan	21
2.2.6	Uji Kognitif pada Manusia	22
2.3	Hewan Coba Penelitian	25
2.3.1	Pemilihan Hewan Coba	25
2.3.2	Efek Fluorida pada Hewan Coba	26
2.3.3	Uji Kognitif Hewan Coba	29
2.4	Hubungan antara Fluorida dengan Fungsi Kognitif	31
2.4.1	Hubungan antara Fluorida dengan Perilaku Hewan Coba	31
2.4.2	Hubungan antara Fluorida dengan Struktur Otak Terkait Fungsi Kognitif dan Reseptor NMDA	32
2.5	Kerangka Teori	34
2.6	Kerangka Konsep	35
BAB 3	METODE PENELITIAN	36
3.1	Jenis Penelitian	36
3.2	Waktu dan Tempat Penelitian	36
3.3	Populasi dan Sampel	36
3.3.1	Populasi Penelitian	36
3.3.2	Sampel Penelitian	36
3.4	Variabel Penelitian	38
3.4.1	Variabel Bebas	38
3.4.2	Variabel Terikat	38
3.5	Definisi Operasional	39
3.6	Rencana Prosedur Kerja	41
3.6.1	Alat dan Bahan	41
3.6.2	Persiapan Hewan Coba	42
3.6.3	Persiapan dan Penentuan Dosis Larutan Sodium Fluorida	42
3.6.4	Prosedur Tes Perilaku Fungsi Kognitif (OLT dan ORT)	43

3.6.5	Prosedur Pemeriksaan Western Blot	45
3.7	Pengolahan dan Analisis Data.....	48
3.8	Alur Kerja Penelitian.....	49
BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN	50
4.1	Hasil Penelitian	50
4.1.1	Karakteristik Rerata Berat Badan Subjek Penelitian	50
4.1.2	Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji Korelasi Data Perilaku terkait Fungsi Kognitif pada OLT dan ORT	51
4.1.3	Hubungan Antar Dosis Paparan Fluorida pada OLT dan ORT	55
4.1.4	Hasil Isolasi Protein pada Pemeriksaan <i>Western Blot</i> pada protein Grin2a pada Reseptor NMDA di Hipokampus Mencit.....	56
4.2	Pembahasan.....	59
4.3	Keterbatasan Penelitian	63
BAB 5	Kesimpulan dan saran	64
5.1	Kesimpulan	64
5.2	Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA		65
LAMPIRAN.....		73
BIODATA		80

DAFTAR TABEL

1. Definisi operasional.....	39
2. Jadwal kegiatan pelaksanaan penelitian.....	53
3. Nilai rerata berat badan subjek penelitian.....	55
4. Uji normalitas serta homogenitas rasio diskriminasi uji OLT.....	58
5. Uji normalitas serta homogenitas rasio diskriminasi uji ORT.....	58
6. Hubungan antar dosis paparan fluorida pada uji OLT.....	59
7. Hubungan antar dosis paparan fluorida pada uji ORT.....	60
8. Pengenceran sampel dalam tahap optimasi isolasi protein.....	62

DAFTAR GAMBAR

1. Struktur sistem limbik.....	13
2. Pemetaan lokasi dan fungsi <i>glutamateric resceptos</i>	18
3. Reseptor glutamat NMDA dan AMPA menginduksi.....	20
4. Montreal Cognitive Assessment Indonesia (MoCA-Ina)	23
5. Mini-Mental State Examination (MMSE)	24
6. Mencit <i>Mus musculus</i> galur C57BL/6.....	26
7. Efek neurotoksisitas fluoride.....	28
8. Novel Object Recognition Test.....	29
9. Object Location Test.....	30
10. Morris Water Maze Test.....	31
11. Alat Object Location Test (OLT).....	44
12. Alat Object Recognition Test (ORT).....	44
13. Alat Isolasi Protein pada Western Blot.....	46
14. Nilai rerata rasio diskriminasi pada uji OLT.....	56
15. Nilai rerata rasio diskriminasi pada uji ORT.....	57
16. Gambaran hasil isolasi protein sebelum tahap Western Blot.....	60

DAFTAR SINGKATAN

WHO	: World Health Organization
Kemenkes	: Kementrian Kesehatan
EPA	: Environment Protection Agency
MoCA-B	: <i>Montreal Cognitive Assessment Basic</i>
AD-8	: <i>Ascertain Dementia 8</i>
MMSE	: <i>Mini-Mental State Examination</i>
RT-PCR	: <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
NMDA	: Reseptor <i>N-metil-d-aspartat</i>
AMPA	: Reseptor <i>alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
OLT	: <i>Object Location Test</i>
ORT	: <i>Object Recognition Test</i>
Grin2a	: <i>Glutamate ionotropic receptor NMDA subunit 2a</i>
Ppm	: <i>Part per million</i>
HF	: <i>Hydrogen Fluoride</i>
SF ₆	: <i>Sulfur hexafluoride</i>
SiF ₄	: <i>Silicon tetrafluoride</i>
H ₂ SIF ₄	: <i>Hexafluorosilicic acid</i>
IQ	: <i>Intelligence quotient</i>
TSH	: <i>Thyroid-stimulating hormone</i>
T3	: <i>Thyroid hormone triiodothyronine</i>
T4	: <i>Thyroid hormone thyroxine</i>
PTH	: <i>Parathyroid hormone</i>
LTP	: <i>Long-term potentiation</i>
NT	: <i>Neurotransmitter</i>

SSP	: Sistem Saraf Pusat
GABA	: <i>γ-Aminobutyric acid</i>
GABAA	: <i>γ-Aminobutyric acid sub-type A</i>
GABAB	: <i>γ-Aminobutyric acid sub-type B</i>
NOR	: <i>Novel Object Recognition</i>
MWM	: <i>Morris Water Maze</i>
MAP2	: Microtubule-associated protein 2
NaF	: Sodium Fluorida
SYP	: <i>Synaptophysin</i>
Dbrn	: Drebrin
TBS	: <i>Tris-buffered saline</i>
SDS	: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
RPM	: <i>Revolution per minute</i>
TBST	: <i>Tris-Buffered Saline – Tween</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fungsi kognitif merupakan sistem otak pada individu dalam mengatur proses kognisi dan mental untuk persepsi, penalaran, perolehan pengetahuan, pemilahan informasi, dan pemecahan masalah^{1,2} Domain sensasi, persepsi, kemampuan motorik, atensi dan konsentrasi, memori, fungsi eksekutif, kecepatan proses belajar, dan keterampilan berbahasa adalah domain yang berperan dalam pengaturan fungsi kognitif pada manusia.³ Fungsi kognitif pada manusia terus mengalami perubahan pada setiap pertambahan usia. Ketika individu memasuki usia lanjut (usia > 65 tahun) mulai terjadi proses penuaan. Proses penuaan didefinisikan penurunan fungsi fisiologis tubuh akibat kerusakan internal secara bertahap sehingga individu sampai di titik mengalami kematian. Fungsi fisiologis yang menurun pada proses penuaan berhubungan sistem organ pada tubuh.⁴

Proses penuaan pada manusia memiliki dampak penurunan fungsi kognitif.⁵ Secara fisiologis, penurunan kognitif dapat terjadi akibat perubahan struktur dan fungsi otak seiring dengan proses menua walaupun pada setiap individu menciptakan variasi penurunan domain kognitif yang berbeda. Selain faktor usia, beberapa faktor yang dapat merusak fungsi kognitif otak antara lain penyakit saraf terkait usia, penyakit saraf akibat trauma fisik, faktor hormonal, dan faktor lingkungan.⁶

Penurunan fungsi kognitif akibat faktor lingkungan berkaitan dengan paparan kimia yang bisa menjadi zat toksik pada otak.⁶ Beberapa logam dan mineral yang dapat menyebabkan neurotoksik dan berpengaruh pada kognitif ialah timbal, arsen, silica, dan merkuri.⁷⁻¹⁰ Selain zat ini, salah satu mineral yang sekarang banyak diteliti yang dapat mempengaruhi fungsi kognitif otak adalah fluorida¹¹.

Fluorida merupakan salah satu mineral yang paling banyak tersebar di bumi. Senyawa ini berasal dari bebatuan. Fluorida dapat ditemukan dengan jumlah yang

bervariasi di dalam makanan, minuman, suplemen, dan produk kesehatan seperti pasta gigi berflourida. Sumber flourida terbanyak salah satunya ialah air yang berasal dari perairan alami, seperti air tanah, sungai, danau, dan laut.¹²⁻¹⁶ Kebanyakan masyarakat mengolah dan mengonsumsi air minum langsung perairan. Kemungkinan mineral seperti flourida dapat masuk ke dalam tubuh dengan konsentrasi yang tidak dapat ditentukan.

Meskipun tidak semua perairan tercemar flourida, World Health Organization (WHO) menyatakan terdapat daerah endemik fluorosis terkait dengan paparan flourida tinggi yang ditemukan di beberapa tempat di dunia, salah satunya ada di Indonesia.¹⁷ Penelitian mengenai flourida di Indonesia sudah dilakukan di daerah sekitar kawasan vulkanik, salah satunya pada kaki Gunung Kawah Ijen konsentrasi flourida pada sungai yang digunakan sebagai sumber air di kawasan tersebut, yaitu 0.51–3.15 ppm.¹⁸ Kecamatan Asembagus sebagai daerah yang menggunakan sumber air tersebut tercatat sebagai daerah endemik fluorosis dengan konsentrasi flourida lebih dari ambang batas yang telah ditetapkan, yaitu rata-rata 2,5 mg/L.^{19,20} Ambang batas maksimal kandungan flourida dalam air minum telah ditetapkan oleh WHO dan Kemenkes, yaitu 1,5 mg/L.^{21,22} Beberapa studi mengidentifikasi adanya peningkatan kasus fluorosis gigi pada anak-anak dan dewasa sebagai dampak tertelannya flourida berlebih dari batas paparan yang dianjurkan.¹³ WHO melaporkan efek lain dari paparan flourida berlebih, antara lain fluorosis tulang, kanker, dan gangguan ginjal.²¹ Environment Protection Agency (EPA) Amerika Serikat juga memaparkan efek lain seperti, hipotiroidisme, gangguan enzim dan elektrolit, serta efek neurotoksisitas.²³

Neurotoksisitas flourida memiliki kaitannya pada gangguan fungsi kognitif. Pada pengaturan fungsi kognitif terdapat komponen, seperti glutamat dan reseptornya. Glutamat merupakan neurotransmitter eksitatorik yang berfungsi dalam mekanisme molekuler fungsi kognitif khususnya penyampaian memori. Glutamat berinteraksi dengan reseptor *N-metil-d-aspartat receptor* (NMDAR), *amino-3-hydroxy-5-methy-4-isoxazole propionate receptor* (AMPA), dan *kainate receptor*. Interaksi glutamat dengan reseptor akan menginisiasi potensial aksi dalam penyampaian impuls pada proses *learning* dan *memory*.

Neurotoksisitas fluorida telah diteliti terhadap gangguan fungsi kognitif manusia yang menyatakan adanya hubungan konsumsi air minum berfluorida tinggi dengan gangguan fungsi kognitif pada lansia (usia > 60 tahun) dengan metode pengukuran MoCA-B dan AD-8.²⁴ Penelitian lain di daerah Cina meneliti lansia 60 tahun yang mengalami fluorosis menggunakan MMSE memiliki potensi untuk mengalami gangguan kognitif lebih rentan.²⁵

Penelitian neurotoksisitas fluorida pada hewan coba telah dikembangkan. Beberapa studi memaparkan adanya gangguan penyampaian dan pembentukan memori akibat induksi fluorida. Penelitian eksperimental sodium fluorida pada mencit yang dilakukan beberapa tes perilaku kognitif menggunakan *novel object recognition test*, *Morris water maze test*, dan *elevated-plus maze* menunjukkan adanya penurunan fungsi kognitif mencit.²⁶ Berkaitan dengan penelitian histopatologi dan struktural terkait fungsi kognitif, pada otak mencit yang diinduksi fluorida menilai jumlah sel glial dan sel piramidal di korteks serebral yang mengalami penyusutan. Penelitian yang sama menunjukkan mikrotubuli di neuron penyusun hipokampus, seperti *mikrotubule-associated protein 2* (MAP2), *synaptophysin* (SYP), dan *drebrin* (Dbn) pada tingkat mRNA didapatkan hasil penurunan ekspresi protein tersebut.²⁷ Di hipokampus, kepadatan neuron juga menurun dikarenakan neurogeneratif struktur cornu amonus (CA) dan girus dendatus akibat disfungsi mitokondria dan stress oksidatif oleh paparan fluorida dalam jangka panjang.^{28,29} Pada tingkat protein penyusun sel neuron, seperti kadar *postsynaptic density protein 95* (PSD-95), rasio protein sub unit AMPA (Gria1, Gria2, dan Gria3) dan subunit NMDA (Grin1, Grin2, dan Grin3) pada membran sel neuron juga mengalami penurunan akibat paparan fluorida. Pada penelitian terhadap kadar protein reseptor glutamat yang dinilai pada RT-PCR didapatkan hasil protein Grin2a mengalami penyusutan paling signifikan.³⁰⁻³² Dari beberapa penelitian ini dapat disimpulkan fluorida dapat mempengaruhi struktur di hipokampus otak yang berdampak pada penurunan kinerja otak sehingga mempengaruhi fungsi kognitif.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui dampak fluorida pada fungsi kognitif hewan coba. Peneliti telah melakukan eksperimen pada mencit

(*Mus musculus*) galur C57BL/6 yang diinduksi sodium flourida dengan menilai perilaku kognitif mencit dan pemeriksaan protein pada reseptor NMDA di hipokampus otak mencit untuk mengukur apakah ada hubungan yang signifikan pada penurunan fungsi kognitif.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat efek paparan sodium flourida pada perilaku terkait fungsi kognitif dan reseptor NMDA pada mencit?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek paparan sodium flourida pada perilaku terkait fungsi kognitif dan reseptor NMDA pada mencit.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui efek paparan sodium flourida terhadap fungsi memori melalui tes *Object Location Test* (OLT) dan *Object Recognition Test* (ORT) mencit.
2. Mengetahui efek paparan sodium flourida terhadap kadar protein Grin2a pada reseptor NMDA di hipokampus mencit.

1.4 Hipotesis Penelitian

Paparan sodium flourida dalam kadar dan durasi paparan tertentu memiliki efek dalam penurunan fungsi kognitif pada mencit.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi bahan literatur tentang pengetahuan dan wawasan ilmiah pada penelitian hewan coba kedepannya dalam melakukan penelitian terhadap tes kognitif pada mencit (*Mus musculus*) akibat paparan flourida.

1.5.2 Manfaat Kebijakan

Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi pertimbangan kebijakan pemerintah tentang pengaturan kualitas air minum terkait dengan batas paparan flourida pada air minum. Selain itu, penelitian ini dapat menjadi pertimbangan pemerintah dalam melakukan skrining fungsi kognitif secara dini pada lansia yang tinggal di daerah endemik fluorida.

1.5.3 Manfaat Masyarakat

Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi pertimbangan dalam mengedukasi masyarakat dalam memilah sumber air minum dan menghindari air minum dengan paparan fluorida yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Encyclopedia of Quality of Life and Well-Being Research. Encyclopedia of Quality of Life and Well-Being Research. Springer Netherlands; 2014.
2. Fisher GG, Chacon M, Chaffee DS. Theories of cognitive aging and work. In: *Work Across the Lifespan*. Elsevier; 2019. p. 17–45.
3. Harvey PD. Domains of cognition and their assessment. *Dialogues Clin Neurosci*. 2019;21(3):227–37.
4. Rose MR, Flatt T, Graves JL, Greer LF, Martinez DE, Matos M, et al. What is aging? Vol. 3, *Frontiers in Genetics*. 2012.
5. Glisky EL. Changes in Cognitive Function in Human Aging. In: Riddle DR, editor. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. 2007.
6. Murman D. The Impact of Age on Cognition. *Semin Hear*. 2015 Aug;36(3):111–21.
7. Liu K sheng, Hao J hu, Zeng Y, Dai F chun, Gu P qing. Neurotoxicity and Biomarkers of Lead Exposure: a Review. *Chinese Medical Sciences Journal*. 2013 Sep;28(3):178–88.
8. Mochizuki H. Arsenic Neurotoxicity in Humans. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 11;20(14):3418.
9. Wu J, Wang C, Sun J, Xue Y. Neurotoxicity of Silica Nanoparticles: Brain Localization and Dopaminergic Neurons Damage Pathways. *ACS Nano*. 2011 Jun 28;5(6):4476–89.
10. Santos-Sacramento L, Arrifano GP, Lopes-Araújo A, Augusto-Oliveira M, Albuquerque-Santos R, Takeda PY, et al. Human neurotoxicity of mercury in the Amazon: A scoping review with insights and critical considerations. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021 Jan;208:111686.
11. Guth S, Hüser S, Roth A, Degen G, Diel P, Edlund K, et al. Toxicity of fluoride: critical evaluation of evidence for human developmental neurotoxicity in epidemiological studies, animal experiments and in vitro analyses. Vol. 94, *Archives of Toxicology*. Springer; 2020. p. 1375–415.
12. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik and. Fluoride: a Review of Use and Effects on Health. *Materia Socio Medica*. 2016;28(2):133.

13. Peckham S, Awofeso N. Water fluoridation: A critical review of the physiological effects of ingested fluoride as a public health intervention. Vol. 2014, The Scientific World Journal. ScientificWorld Ltd.; 2014.
14. Aoun A, Darwiche F, Al Hayek S, Doumit J. The fluoride debate: The pros and cons of fluoridation. Vol. 23, Preventive Nutrition and Food Science. Korean Society of Food Science and Nutrition; 2018. p. 171–80.
15. Centers for Disease Control and Prevention. About Fluoride. Centers for Disease Control and Prevention. 2023.
16. American Dental Association. Fluoridation FAQs [Internet]. American Dental Association. [cited 2023 Jul 26]. Available from: <https://www.ada.org/resources/community-initiatives/fluoride-in-water/fluoridation-faqs>
17. Water SH and H. GUIDELINES FOR DRINKING-WATER QUALITY: FOURTH EDITION INCORPORATING THE FIRST AND SECOND ADDENDA. World Health Organization. 2022.
18. Budipramana ES, Hapsoro A, IRMAWATI ES, Kuntari S. Dental fluorosis and caries prevalence in the fluorosis endemic area of Asembagus, Indonesia. *Int J Paediatr Dent*. 2002 Nov 11;12(6):415–22.
19. Löhr A, Bogaard T, Heikens A, Hendriks M, Sumarti S, Bergen M van, et al. Natural Pollution Caused by the Extremely Acid Crater Lake Kawah Ijen, East Java, Indonesia (7 pp). *Environ Sci Pollut Res Int*. 2005 Mar 30;12(2):89–95.
20. Wacano D. GROUNDWATER FLUORIDE HAZARD ZONATION IN THE VOLCANOGENIC POLLUTED AREA, EAST JAVA, INDONESIA. *International Journal of GEOMATE*. 2022 Jun 1;22(94).
21. Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, Magara Y. Fluoride in Drinking-water [Internet]. 2006. Available from: <http://www.who.int/bookorders>
22. PMK No. 492 ttg Persyaratan Kualitas Air Minum.
23. EPA. Fluoride in Drinking Water [Internet]. Fluoride in Drinking Water. National Academies Press; 2006 [cited 2023 Jul 26]. Available from: <https://nap.nationalacademies.org/download/11571>

24. Ren C, Zhang P, Yao XY, Li HH, Chen R, Zhang CY, et al. The cognitive impairment and risk factors of the older people living in high fluorosis areas: DKK1 need attention. *BMC Public Health*. 2021;21(1):2237.
25. Li M, Gao Y, Cui J, Li Y, Li B, Liu Y, et al. Cognitive Impairment and Risk Factors in Elderly People Living in Fluorosis Areas in China. *Biol Trace Elem Res*. 2016 Nov 25;172:53–60.
26. Liu F, Ma J, Zhang H, Liu P, Liu YP, Xing B, et al. Fluoride exposure during development affects both cognition and emotion in mice. *Physiol Behav*. 2014 Jan;124:1–7.
27. Ge Y, Chen L, Yin Z, Song X, Ruan T, Hua L, et al. Fluoride-induced alterations of synapse-related proteins in the cerebral cortex of ICR offspring mouse brain. *Chemosphere*. 2018 Jun;201:874–83.
28. Wang D, Cao L, Pan S, Wang G, Wang L, Cao N, et al. Sirt3-mediated mitochondrial dysfunction is involved in fluoride-induced cognitive deficits. *Food and Chemical Toxicology*. 2021 Dec;158:112665.
29. Bittencourt LO, Dionizio A, Ferreira MKM, Aragão WAB, de Carvalho Cartágenes S, Puty B, et al. Prolonged exposure to high fluoride levels during adolescence to adulthood elicits molecular, morphological, and functional impairments in the hippocampus. *Sci Rep*. 2023 Jul 8;13(1):11083.
30. Yang L, Jin P, Wang X, Zhou Q, Lin X, Xi S. Fluoride activates microglia, secretes inflammatory factors and influences synaptic neuron plasticity in the hippocampus of rats. *Neurotoxicology*. 2018 Dec;69:108–20.
31. Nadei O, Agalakova N. Effect of chronic F⁻ exposure on ionotropic glutamate AMPA and NMDA receptors in rat hippocampus. *Res Sq*. 2023 Jul 17;
32. Sarahdeaz S. Pengaruh Paparan Fluorida Selama Periode Laktasi Terhadap Perilaku Terkait Fungsi Kognitif, Reseptor Glutamat, dan Postsynaptic Dencity Protein Pada Mencit (*Mus musculus*) Galur C57BL/6. [Palembang]: University Sriwijaya; 2023.
33. National Center for Biotechnology Information. Fluoride Ion. PubChem Compound Summary for CID 28179. 2023.

34. Aoun A, Darwiche F, Al Hayek S, Doumit J. The fluoride debate: The pros and cons of fluoridation. Vol. 23, Preventive Nutrition and Food Science. Korean Society of Food Science and Nutrition; 2018. p. 171–80.
35. Peckham S, Awofeso N. Water fluoridation: A critical review of the physiological effects of ingested fluoride as a public health intervention. Vol. 2014, The Scientific World Journal. ScientificWorld Ltd.; 2014.
36. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik and. Fluoride: a Review of Use and Effects on Health. *Materia Socio Medica*. 2016;28(2):133.
37. Nassar Y, Brizuela M. The Role of Fluoride on Caries Prevention. *StatPearls* ; 2023.
38. Solanki YS, Agarwal M, Gupta AB, Gupta S, Shukla P. Fluoride occurrences, health problems, detection, and remediation methods for drinking water: A comprehensive review. Vol. 807, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V.; 2022.
39. Yousefi M, Ghalehaskar S, Asghari FB, Ghaderpoury A, Dehghani MH, Ghaderpoori M, et al. Distribution of fluoride contamination in drinking water resources and health risk assessment using geographic information system, northwest Iran. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2019 Oct 1;107.
40. Jayarathne T, Stockwell CE, Yokelson RJ, Nakao S, Stone EA. Emissions of Fine Particle Fluoride from Biomass Burning. *Environ Sci Technol*. 2014 Nov 4;48(21):12636–44.
41. ATSDR. ATSDR MMG for Fluoride.
42. Liteplo R, World Health Organization., United Nations Environment Programme., International Labour Organisation., Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals., International Program on Chemical Safety., et al. Fluorides. World Health Organization; 2002. 268 p.
43. Dec K, Łukomska A, Maciejewska D, Jakubczyk K, Baranowska-Bosiacka I, Chlubek D, et al. The Influence of Fluorine on the Disturbances of Homeostasis in the Central Nervous System. *Biol Trace Elem Res*. 2017 Jun 27;177(2):224–34.
44. Pollick H. The Role of Fluoride in the Prevention of Tooth Decay. *Pediatr Clin North Am*. 2018 Oct;65(5):923–40.

45. Chan AKY, Tamrakar M, Jiang CM, Tsang YC, Leung KCM, Chu CH. Clinical evidence for professionally applied fluoride therapy to prevent and arrest dental caries in older adults: A systematic review. *J Dent*. 2022 Oct;125:104273.
46. Whelton HP, Spencer AJ, Do LG, Rugg-Gunn AJ. Fluoride Revolution and Dental Caries: Evolution of Policies for Global Use. *J Dent Res*. 2019 Jul 8;98(8):837–46.
47. Wang SX, Wang ZH, Cheng XT, Li J, Sang ZP, Zhang XD, et al. Arsenic and Fluoride Exposure in Drinking Water: Children's IQ and Growth in Shanyin County, Shanxi Province, China. *Environ Health Perspect*. 2007 Apr;115(4):643–7.
48. Mayza A, Lastri DN. BUKU AJAR NEUROLOGI (BUKU 1). Aninditha T, Wiratman W, editors. Jakarta: Penerbit Kedokteran Indonesia; 2017.
49. Hall JE, Guyton AC. Guyton dan Hall Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Elsevier; 2014.
50. Poulos Despopoulos A, Silbernagl S. Color Atlas of Physiology. 5th ed. Stuttgart: Thieme; 2003.
51. Bahrudin M. Pemeriksaan Klinis di Bidang Penyakit Syaraf. Malang: UMM Press; 2011. 25–47 p.
52. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses . Howard Hughes Medical Institute. 2000;
53. Bhinney M. Struktur dan Proses Memori. Buletin Psikologi Fakultas Psikologi Universitas Gadjah Mada. 2008;16(2):74–88.
54. Bear M, Connors B, Paradiso M. Neurosci: Exploring the Brain. 4th ed. Baltimore (Phi): Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
55. Almaraz-Espinoza A, Grider MH. Physiology, Long Term Memory. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2023.
56. Bahrudin M. Neurologi Klinis. UMM Press; 2013. 377 p.
57. Stallard CN, Anoruo M, Saadabadi A. Biochemistry, Glutamate. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2022.
58. Institute of Medicine (US) Forum on Neuroscience and Nervous System Disorders. Glutamate-Related Biomarkers in Drug Development for

- Disorders of the Nervous System: Workshop Summary. . Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
59. Pal MM. Glutamate: The Master Neurotransmitter and Its Implications in Chronic Stress and Mood Disorders. *Front Hum Neurosci.* 2021;15:722323.
 60. Kalat JW. *Biological Psychology* . 13th ed. Boston: Cengage; 2019.
 61. MacWilliam L. *Modern theories of aging*. Summerland.
 62. Chang HJ, Burke AE, Glass RM. Older drivers and cognitive impairment. *American Med Ass.* 2010;303(16):1660–3.
 63. McMorris T, Tomporowsky PD, Audiffren M. *Excercise and Cognitive Fuction* . 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009.
 64. Cole GM, Frautschy SA. Docosaehaenoic acid protects from amyloid and dendritic pathology in an alzheimer’s disease mouse model. *Nutririon and Health.* 2006;18:249–59.
 65. Nasreddine ZS, Phillips NA, BÃ©dirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A Brief Screening Tool For Mild Cognitive Impairment. *J Am Geriatr Soc.* 2005 Apr;53(4):695–9.
 66. Kochhann R, Varela JS, Lisboa CS de M, Chaves MLF. The Mini Mental State Examination: Review of cutoff points adjusted for schooling in a large Southern Brazilian sample. *Dement Neuropsychol.* 2010 Mar;4(1):35–41.
 67. The Jackson Laboratory. C57BL/6-Ins2Akita/J [Internet]. The Jackson Laboratory. 2023 [cited 2023 Dec 27]. Available from: <https://www.jax.org/strain/003548>
 68. Program N. NTP toxicology and carcinogenesis studies of sodium fluoride (CAS No. 7681-49-1)in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). *Natl Toxicol Progr Tect Rep Ser.* 1990;393(448).
 69. Turner C. Fluorida Reduces Bone Strength in Older Rats. *J Dent Res.* 1995;74:1475–81.
 70. Bhatnagar M&, Rao P, Sushma J, Bhatnagar R. Neurotoxicity of fluoride: neurodegeneration in hippocampus of female mice. *Indian journal of experimental biolog.* 2002;40(5):546–54.

71. Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 1995 Mar;17(2):169–77.
72. Żwieręło W, Maruszewska A, Skórka-Majewicz M, Gutowska I. Fluoride in the Central Nervous System and Its Potential Influence on the Development and Invasiveness of Brain Tumours—A Research Hypothesis. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 13;24(2):1558.
73. Vogel-Ciernia A, Wood MA. Examining Object Location and Object Recognition Memory in Mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2014 Oct 8;69(1).
74. Stanford Medicine. 2-Object Novel Object Recognition [Internet]. Stanford Medicine. 2023 [cited 2023 Aug 18]. Available from: <https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/lm/bml-novel.html>
75. Stanford Medicine. Object-Location Memory Task [Internet]. Stanford Medicine . 2023 [cited 2023 Aug 18]. Available from: <https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/lm/bml-object.html>
76. Stanford Medicine. Morris Water Maze [Internet]. Stanford Medicine. 2023 [cited 2023 Aug 18]. Available from: <https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/lm/mwml.html>
77. Nunez J. Morris Water Maze Experiment. *Journal of Visualized Experiments*. 2008 Sep 24;(19).
78. Irfannuddin. Cara Sistematis Berlatih Meneliti: Merangkai Sistematika Penelitian Kedokteran dan Kesehatan. Shahab S, Setiawan D, editors. Jakarta: Rayyana Komunikasindo; 2015.
79. Wei Q, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. A mini review of fluoride-induced apoptotic pathways. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018 Dec 18;25(34):33926–35.
80. Zhao Y, Wang J, Zhang J, Sun Z, Niu R, Manthari RK, et al. Fluoride exposure induces mitochondrial damage and mitophagy via activation of the IL-17A pathway in hepatocytes. *Science of The Total Environment*. 2022 Jan;804:150184.
81. Ekambaram P, Paul V. Modulation of Fluoride Toxicity in Rats by Calcium Carbonate and by Withdrawal of Fluoride Exposure. *Pharmacol Toxicol*. 2002 Feb 17;90(2):53–8.

82. Pillai KS, Mathai AT, Deshmukh PB. Effect of subacute dosage of fluoride on male mice. *Toxicol Lett.* 1988 Nov;44(1–2):21–9.
83. BIO-RAD. Western Blot Troubleshooting: No Bands [Internet]. BIO-RAD. 2023 [cited 2023 Dec 28]. Available from: <https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blot-no-bands-western-blotting.html>