

Struktur Histologis Pulpa Putih Limpa Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) setelah Pemberian Sediaan Nanokitosan Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)

*Histological Structure of White Pulp Spleen White Rat (*Rattus norvegicus* L.) after Induced of Nanochitosan Preparation of Neem Leaf (*Azadirachta indica* A. Juss) Ethanol Extract*

Putri Lestari Ningtias¹, Teguh Suprihatih¹, Agung Janika Sitasiwi^{1*}

¹Departemen Biologi, Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia

*Corresponding author; Email: agssiwi@yahoo.co.id

Naskah diterima: 23 Desember 2023, direvisi: 30 April 2024, disetujui: 1 Desember 2024

Abstract

Agents of immunomodulation are compounds that have the ability to balance the immune system throughout the body. The neem plant is one of the herbal plants that is often used as traditional medicine. Neem leaves (*Azadirachta indica* A. Juss) contain antioxidants that have the potential to be antiinflammatory, antiviral, and as an immunomodulatory agent. The constraint in giving medicine orally is the low bioavailability of drugs and the distribution of active compounds of herbal plants. This problem can be solved by packaging herbal plant extracts in nanochitosan. The purpose of this study was to analyze the effect of induced of a nanochitosan ethanol extract of neem leaves on the histological structure of the spleen tissue of female Wistar white rats. This study used a randomized design (CRD) which was divided into 3 treatment groups with 4 repetitions. Treatments include control (P0), an ethanol extract of neem leaves 2 ml/head/day (P1), and nanochitosan preparation of neem leaves 2 ml/head/day (P2). The parameters measured were the diameter of white pulp, the diameter of germinal centre, the area of white pulp, and the area of germinal centre in the spleen. Data on the diameter and the area of the white pulp and germinal centre were analyzed statistically parametrically with ANOVA with a 95% level of confidence, if the data were not normally distributed, the Kruskal Wallis nonparametric test was carried out. Data that were significantly different were carried out by Duncan's further test. The results showed that the treatment of nanochitosan preparations of neem leaf ethanol extract had a significant difference in the diameter of the white pulp and germinal centre as well as the area of the white pulp and germinal centre ($P < 0,05$). The conclusion of this study was that the nanochitosan preparation ethanol extract of neem leaves at a dose of 14 mg/kg BB can increase the diameter and the area of the white pulp and germinal centre.

Keywords: nanochitosan; white pulp, germinal centre

Abstrak

Agen imunomodulator merupakan senyawa yang dapat menyeimbangkan sistem imun di dalam tubuh. Tanaman mimba merupakan salah satu tanaman herbal yang sering digunakan sebagai obat tradisional. Daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) memiliki kandungan antioksidan yang berpotensi sebagai antiinflamasi, antivirus, dan sebagai agen imunomodulator. Kendala dalam pemberian obat secara oral salah satunya disebabkan karena rendahnya bioavailabilitas obat dan distribusi senyawa aktif tanaman herbal. Salah satu cara untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan mengemas ekstrak daun mimba dalam bentuk nanokitosan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh pemberian sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba terhadap struktur histologis jaringan limpa tikus putih galur Wistar betina. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dengan 4 kali pengulangan. Perlakuan meliputi kontrol (P0), ekstrak etanol daun mimba 2ml/ekor/hari (P1), dan sediaan nanokitosan

ekstrak etanol daun mimba 2ml/ekor/hari (P2). Parameter yang diukur adalah diameter pulpa putih, diameter *germinal center*, luas pulpa putih, dan luas *germinal center* pada limpa. Data diameter dan luas pulpa putih serta *germinal center* dianalisis secara statistik parametrik dengan uji ANOVA pada taraf kepercayaan 95%, jika data tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji nonparametrik *Kruskall Wallis*. Data yang berbeda nyata dilakukan uji lanjut Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba berbeda nyata terhadap diameter pulpa putih dan *germinal center* serta luas pulpa putih dan *germinal center* ($P < 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini yaitu pemberian sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kg BB dapat meningkatkan diameter dan luas pulpa putih serta *germinal center*.

Kata kunci: nanokitosan; pulpa putih, *germinal center*

Pendahuluan

Limpa merupakan organ limfoid yang memiliki peran penting dalam sistem kekebalan tubuh dan termasuk organ limfoid terbesar. Limpa adalah komponen sistem limfoid perifer yang memiliki fungsi untuk menghasilkan limfosit, destruksi eritrosit, pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme yang memasuki aliran darah, dan sebagai tempat penampungan darah (Makiyah dkk., 2014). Nata dkk. (2021) menyatakan bahwa limpa disusun oleh pulpa putih yang terdiri dari nodul limfoid dan *Periarteriolar Lymphoid Sheats* (PLAS) serta juga disusun oleh pulpa merah yang terdiri dari sinusoid dan korda limpa. Pulpa putih memiliki fungsi sebagai tempat produksi antibodi dan pematangan limfosit T serta makrofag (Mescher, 2012).

Aktivitas sistem imun yang meningkat dapat disebabkan karena adanya pemberian senyawa yang dapat meningkatkan aktivitas sistem imun atau yang dikenal sebagai imunomodulator. Imunomodulator merupakan senyawa yang memiliki efek modulasi terhadap sistem imun dengan melakukan dinamisasi regulasi sel-sel imun seperti sitokin (Puspitaningrum dkk., 2017). Imunomodulator berfungsi untuk memperbaiki sistem imun dengan cara menstimulasi (imunostimulan) atau menekan reaksi imun (imunosupresan) yang abnormal (Perdana, 2022).

Penggunaan tanaman herbal sebagai obat tradisional di Indonesia sudah berlangsung sejak ribuan tahun yang lalu, sebelum obat modern ditemukan dan dipasarkan. Tanaman herbal banyak digunakan sebagai obat alternatif karena beberapa hal, seperti mahalnnya atau tidak tersedianya obat sintetis serta adanya

kepercayaan masyarakat bahwa obat tradisional lebih aman (Dewi dkk., 2017). Salah satu tanaman herbal yang telah banyak digunakan sebagai obat tradisional adalah mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) (Setiawan dkk., 2021). Sarkar dkk. (2021) menyatakan bahwa mimba dapat dijadikan sebagai agen imunomodulator karena mimba menunjukkan potensi terapeutik yang luas, antara lain sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikanker, antiangiogenesis, dan agen imunomodulator.

Senyawa asing yang masuk ke dalam tubuh sebagai obat, secara farmakokinetik terjadi melalui proses absorpsi, distribusi, biotransformasi, dan eliminasi (Sarkar dkk., 2021). Keamanan ekstrak *A. indica* maupun senyawa yang diisolasi harus dievaluasi, terutama menggunakan hewan model dari kelas mamalia (Braga dkk., 2019). Obat yang diberikan secara oral memiliki kekurangan, yaitu adanya bioavailabilitas obat yang rendah dan distribusi senyawa mimba yang rendah ke tubuh (Putri dkk., 2023). Salah satu cara untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan mengemas ekstrak daun mimba dalam bentuk nanokitosan. Mozafari dkk. (2018) menyatakan bahwa nanokitosan dapat mempermudah penyerapan dan pendistribusian obat ke dalam tubuh serta dapat meningkatkan bioavailabilitas daun mimba. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba terhadap struktur histologis jaringan limpa tikus putih yang ditunjukkan dengan perubahan diameter pulpa putih, diameter *germinal center*, luas pulpa putih dan luas *germinal center* pada tikus putih galur Wistar betina.

Materi dan Metode

Bahan dan alat yang digunakan terdiri dari 12 ekor tikus galur Wistar betina dengan bobot badan berkisar ± 200 gram yang diperoleh dari PTUNDIP Mandiri Aneka Jasa Usaha Semarang, ekstrak etanol 96% daun mimba, seperangkat bahan untuk pembuatan sediaan nanokitosan, akuades, sekam padi, air minum, pakan tikus (berupa pakan standar (Charoen Pokphand Indonesia T-51)), larutan garam fisiologis (NaCl), larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10%, pewarna HE, seperangkat bahan pembuatan sediaan histologis, seperangkat kandang pemeliharaan dan perlengkapannya, tempat pakan, tempat minum, sarung tangan, neraca analitik, timbangan digital, *magnetic stirrer*, jarum *gavage* atau sonde, spuit 3 ml, gelas ukur, seperangkat alat bedah (*dissecting set*), erlenmeyer, *beaker glass*, bak paraffin, timbangan hewan, mikroskop fotomikrograf (mikroskop Zeiss), seperangkat alat pembuatan sediaan nanopartikel, serta seperangkat alat pembuatan preparat dengan metode paraffin dan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE).

Proses ekstraksi daun mimba dilakukan sesuai dengan metode Abror dkk. (2018) yaitu daun mimba yang telah kering, kemudian dihaluskan dengan penggiling mekanis dan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran *mesh* 40. Bubuk mimba diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 hari. Proses ekstraksi dilakukan sampai ekstraktif menjadi tidak berwarna. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan proses evaporasi, sampai diperoleh massa setengah padat dengan bebas pelarut. Ekstrak tersebut sudah siap digunakan sebagai bahan uji percobaan.

Pembuatan sediaan nanopartikel kitosan dilakukan dengan melarutkan 1,4 gram kitosan dalam 1 L asam asetat 1%. Sediaan kemudian ditambahkan 700 mg ekstrak dan dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan yang homogen selanjutnya ditambahkan 25 mL larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) 0.1% dan dievaporasi sampai membentuk suspensi nanopartikel

Penelitian ini menggunakan 12 ekor tikus putih galur Wistar betina berumur 2-3 bulan dengan bobot yang dikelompokkan ke dalam 3 kelompok perlakuan dengan 4 ekor ulangan.

Kelompok perlakuan terdiri dari control (aquades 2 ml/ekor/hari), P1 (ekstrak etanol daun mimba 2 ml/ekor/hari), dan P2 (nanokitosan dengan perbandingan 1:2 antara ekstrak daun mimba dan kitosan dalam 2ml kitosan/ekor/hari). Tikus diaklimasi selama 7 hari sebelum diberi perlakuan.

Tikus diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Tikus selanjutnya diberi perlakuan selama 21 hari secara oral menggunakan jarum sonde. Bobot badan tikus ditimbang setiap satu minggu sekali. Hari ke-21 dilakukan proses pembedahan yang diawali dengan melakukan anestesi inhalasi, kemudian dilakukan pengambilan organ limpa untuk pembuatan preparat histologi.

Organ limpa yang telah diisolasi, dicuci menggunakan NaCl 0,9%, kemudian organ limpa ditimbang menggunakan timbangan digital. Organ limpa selanjutnya difiksasi menggunakan *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10% (Setiawan dkk., 2021). Preparat histologi dibuat menggunakan metode paraffin dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE).

Pengamatan preparat dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan optilab. Preparat diamati sebanyak lima bidang pengamatan pada 3 irisan yang dipilih secara acak dengan perbesaran 10 x 10, kemudian diukur diameter pulpa putih, diameter *germinal center*, luas pulpa putih serta luas *germinal center* pada limpa dengan menggunakan aplikasi *advance plus viewer4*. Diameter pulpa putih dan diameter *germinal center* dihitung dengan menjumlahkan diameter maksimum sumbu horizontal (x) dengan diameter maksimum sumbu vertikal (y) kemudian dibagi dua (). Diameter dari lima pulpa putih dan *germinal center* yang representatif dari setiap preparat diukur dan dinyatakan dalam satuan μm (Anggarasari dkk., 2014). Rumus yang digunakan untuk mengukur luas pulpa putih dan *germinal center* dihitung menggunakan rumus luas lingkaran, yaitu $A = \pi r^2$. Keterangan: A = luas pulpa putih dan luas *germinal center* (satuan μm^2), π = rumus phi ($\pi = 3,14$), r = jari-jari pulpa putih dan *germinal center*.

Data yang bersifat numerik diuji dengan *One way ANOVA* pada taraf kepercayaan 95%, apabila terdapat perbedaan nyata pada hasil uji,

dilanjutkan dengan uji Duncan yang merupakan uji lanjutan dengan taraf kepercayaan 95% (nilai $p < 0,05$) untuk melihat perbedaan setiap perlakuan. Data pengamatan histologis dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Semua prosedur penelitian ini telah lolos kaji etik dengan nomor surat 50/EC/H/FK-UNDIP/VI/2022 yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. Uji kelayakan ini dilakukan sebelum melakukan percobaan untuk menjaga keselamatan dan keamanan untuk subyek penelitian yang digunakan yaitu hewan uji, serta memperkecil kesalahan dalam penelitian.

Hasil analisis uji rata diameter dan luas pada pulpa putih serta *germinal center* yang diberi ekstrak etanol daun mimba serta sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) pada masing-masing kelompok perlakuan dengan lama waktu percobaan selama 21 hari menggunakan uji *one way ANOVA* pada taraf kepercayaan 95% dengan SPSS versi 26 disajikan pada Tabel 1.

Hasil uji ANOVA pada rata-rata diameter pulpa putih memiliki nilai Sig. sebesar 0,021, diameter *germinal center* memiliki nilai Sig. sebesar 0,032, luas pulpa putih memiliki nilai Sig. 0,032, dan luas *germinal center* memiliki nilai Sig. sebesar 0,041 yang artinya nilai $P < 0,05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian bahan uji ekstrak etanol daun mimba (P1) dan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba (P2) memberikan pengaruh yang berbeda nyata atau berbeda bermakna terhadap kelompok perlakuan kontrol (P0). Kelompok perlakuan ekstrak etanol

daun mimba (P1) berbeda bermakna terhadap kelompok perlakuan kontrol (P0) dan kelompok perlakuan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba (P2). Hasil uji statistik lanjut dengan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan P0 dengan P1 dan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara P0 dengan P2.

Hasil berbeda bermakna pada peningkatan diameter dan luas pulpa putih serta *germinal center* diduga disebabkan karena adanya kandungan senyawa flavonoid yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2). Sukmayadi dkk. (2014) dalam penelitiannya menunjukkan hasil yang sama bahwa daun zaitun mengandung beberapa bahan aktif seperti oleorupin, tirosol, hidroksitirosol, alfa-tokoferol, beta-karoten, *squalene*, dan flavonoid yang memiliki efek imunomodulator. Bahan-bahan aktif tersebut dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan menstimulasi produksi IL-2. Hal ini juga didukung oleh Setiawan dkk. (2021) yang menyatakan bahwa perbesaran diameter dan luas pulpa putih disebabkan karena adanya peningkatan aktivitas sistem imun dan proliferasi sel limfosit oleh senyawa flavonoid yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun pepaya *calina*.

Sitasiwi dkk. (2021) dalam penelitiannya menyatakan bahwa Analisa kandungan senyawa bioaktif tanaman mimba menunjukkan ekstrak etanol daun mimba mengandung senyawa fenolik, alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin, dan saponin. Senyawa-senyawa bioaktif tersebut memiliki aktifitas sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, dan antivirus.

Tabel 1. Rerata Diameter Pulpa Putih, Diameter *Germinal Center*, Luas Pulpa Putih, dan Luas *Germinal Center*

Variabel	Kelompok Perlakuan		
	P0 (X ± SD)	P1 (X ± SD)	P2 (X ± SD)
Diameter Pulpa Putih (µm)	541,79 ^a ± 22,80	664,69 ^b ± 71,88	613,55 ^{ab} ± 42,13
Diameter <i>Germinal Center</i> (µm)	258,99 ^a ± 40,11	330,30 ^b ± 35,07	309,06 ^{ab} ± 17,25
Luas Pulpa Putih (µm ²)	230.738,67 ^a ± 19.283,39	349.870,71 ^b ± 78.684,69	296.555,96 ^{ab} ± 40.682,34
Luas <i>Germinal Center</i> (µm ²)	53.602,80 ^a ± 17.166,29	86.473,98 ^b ± 18.887,89	75.157,04 ^{ab} ± 8.194,73

Keterangan: Kontrol (Aquades 2 ml/ekor/hari secara oral), P1 (Ekstrak etanol daun mimba 2 ml/ekor/hari secara oral), P2 (Nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dengan perbandingan 1:2 antara ekstrak daun mimba dan kitosan dalam 2ml kitosan/ekor/hari). Rataan ± Simpangan baku. ^{a-b}Perbedaan notasi pada angka yang diikuti huruf berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Hal ini sesuai dengan Muslih dkk. (2022) yang menyatakan bahwa senyawa flavonoid, terpenoid, alkaloid, dan saponin pada daun mimba memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi

Flavonoid memiliki kemampuan dalam meningkatkan produksi IL-2 yang terlibat aktif dalam aktivasi dan proliferasi sel limfosit (Dewi dkk., 2013; Meliana, 2016). Keberadaan flavonoid dapat meningkatkan sekresi IL-12 oleh *Antigen Presenting Cells* (APCs) untuk selanjutnya menginduksi sel T. Sel T mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi sel Th-1 dan Th-2 (Carmelita, 2016). Sel T yang mengalami proliferasi tersebut menjadi penyebab meningkatnya diameter pulpa putih dan *germinal center* pada limpa tikus.

Senyawa saponin pada ekstrak etanol daun mimba diduga dapat meningkatkan sistem imun dengan menstimulasi peningkatan IL-2. Ali dkk. (2021) dalam penelitiannya menyebutkan daun mimba dalam kadar yang tepat dapat memodulasi sistem dengan meningkatkan kerja sistem imun. Fathir dan Rifa'i (2014) menjelaskan bahwa mekanisme kerja senyawa saponin pada daun kelor sebagai imunostimulan yaitu dengan menstimulasi peningkatan sekresi sitokin yang terlibat dalam proses aktivitas sel T CD4⁺. Saponin merupakan substansi yang berperan penting dalam memicu peningkatan regulasi sel T *helper* dengan merangsang peningkatan produksi sitokin interleukin-2 (IL-2) (Swaroop dkk., 2022).

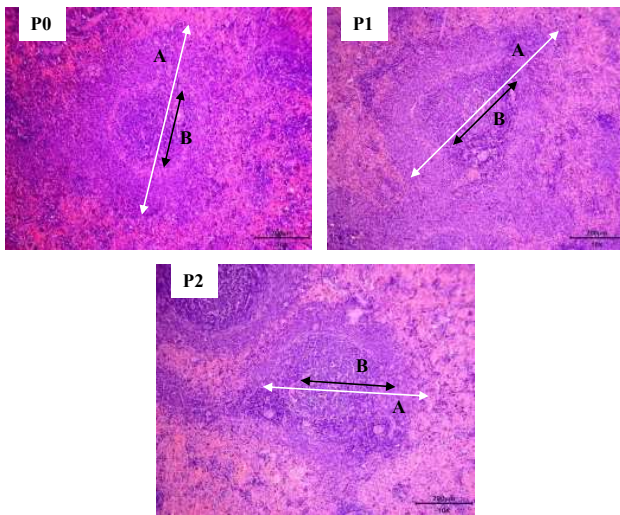
Sholikhah dan Rahayuningsih (2015) menjelaskan bahwa senyawa alkaloid memiliki potensi dalam meningkatkan respon imun. Alkaloid diduga dapat meningkatkan aktivitas IL-2 yang berperan dalam proliferasi limfosit. Kotal dan Kurnia (2022) mendukung hal tersebut yang menjelaskan bahwa mekanisme kerja dari flavonoid dan alkaloid sebagai imunomodulator yaitu dengan cara meningkatkan aktivitas interleukin-2 (IL-2) dan proliferasi limfosit.

Rosnizar dkk. (2018) menyebutkan bahwa senyawa tanin dapat berperan sebagai imunostimulator. Tanin dapat mengoptimalkan fungsi sistem imun yang berperan penting dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap mikroba atau penyakit. Bone dan Mills (2013) menjelaskan

mekanisme tanin sebagai imunostimulator yaitu dengan meningkatkan aktivitas fagositosis dari makrofag saat menghancurkan mikroba. Ulya dkk. (2016) menyatakan bahwa tanin dapat meningkatkan aktivitas limfosit melalui induksi reseptor interleukin-2 *reseptor alpha* (IL-2R α). Interleukin-2 *reseptor alpha* (IL-2R α) akan berikatan secara kompleks dengan IL-2 sehingga dapat mengaktifasi limfosit dan memicu terjadinya proliferasi limfosit yang ditandai dengan adanya pelebaran pada pulpa putih dan *germinal center* pada limpa.

Ku dan Lin (2013) menyebutkan bahwa terpenoid memiliki potensi sebagai imunostimulan. Terpenoid memiliki mekanisme kerja dengan meningkatkan sekresi sitokin sel T *helper* 1 (Th1) dan sel T *helper* 2 (Th2). Sel Th1 berperan dalam mengaktifasi sitokin proinflamasi, seperti IFN γ , IL-2, dan IL-12. Sel Th2 berperan dalam menghasikan sitokin antiinflamasi, yaitu IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10. Renda dkk. (2021) menjelaskan bahwa sel Th1 akan berdiferensiasi menjadi interleukin-2 sehingga dapat memicu limfosit untuk berproliferasi.

Ernis dkk. (2021) menyatakan bahwa mekanisme proliferasi limfosit terjadi karena adanya ikatan antigen pada reseptor permukaan sel T dan sel B, bersama dengan interleukin-1 (IL-1) dari *Antigen Presenting Cell* (APC) dapat mengaktifasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Enzim ini menghidrolisis fosfatidil inositol bifosfat (PIP₂) menjadi diasil gliserol (DAG) dan inositol trifosfat (IP₃) yang terjadi di dalam membran plasma. Diasil gliserol (DAG) mengaktifasi secara langsung protein kinase C dengan cara memfosforilasi residu asam amino (serin atau treonin) pada sel target. Inositol trifosfat (IP₃) kemudian menstimulasi pelepasan Ca²⁺ ke dalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca²⁺ meningkat. Peningkatan Ca²⁺ ini berperan penting dalam menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-lipoxygenase. Protein kinase C menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2). Rosyanti dan Hadi (2020) menyebutkan bahwa aktivasi protein kinase C akan menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2) yang mengaktifasi sel B atau sel T untuk berproliferasi.



Gambar 1. Histologis Limpa Tikus Putih Galur Wistar (Pewarnaan HE, Perbesaran 10 x 10). Keterangan : P0 (Kelompok perlakuan kontrol aquades); P1 (Kelompok perlakuan ekstrak etanol daun mimba); P2 (Kelompok perlakuan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba). Garis putih menunjukkan (A) pulpa putih, Garis hitam menunjukkan (B) *germinal center*

Hasil pengamatan sediaan histologis seluruh kelompok perlakuan (Gambar 1.) menunjukkan bahwa *germinal center* terlihat jelas di dalam pulpa putih. *Germinal center* merupakan bagian dari pulpa putih yang berfungsi sebagai pusat proliferasi sel limfosit. Rousdy dkk. (2017) dalam penelitiannya menyatakan bahwa di dalam pulpa putih terdapat *germinal center* yang berfungsi sebagai pusat pembelahan sel atau proliferasi sel limfosit sehingga komponen sel terlihat lebih rapat. Tasminatun dkk. (2017) mendukung hal tersebut bahwa *germinal center* merupakan tempat sel-sel limfosit berkumpul dan berproliferasi saat sistem imunitas bekerja. Pulpa putih dan *germinal center* yang mengalami perubahan ukuran menandakan seberapa kuat imunostimulan bekerja. Matheos (2014) menyatakan bahwa *germinal center* akan muncul dan membesar jika terjadi proses imunostimulasi pada sistem imun. Diameter pulpa putih, diameter *germinal center*, luas pulpa putih, dan luas *germinal center* yang mengalami peningkatan terjadi akibat adanya proliferasi limfosit dan diferensiasi limfosit.

Pemberiaan sediaan nanokitosan diduga dapat memperbaiki struktur pada limpa tikus putih yang ditunjukkan dengan terlihatnya batas-batas antara pulpa merah, pulpa putih, dan *germinal center* pada kelompok perlakuan

(P2). Yanuhar dkk. (2023) menyatakan bahwa larutan kiotsan dapat meningkatkan sistem imun humoral. Putri dkk. (2023) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa sediaan senyawa yang mengandung flavonoid dalam bentuk kitosan memiliki sifat sebagai immunomodulator, yaitu memodulasi sistem kekebalan tubuh sehingga setiap komponen dalam sistem akan lebih peka terhadap serangan mikroba patogen, dan immunoenhancers, yakni mempertahankan kinerja sistem imun sehingga mekanisme fisiologi dalam tubuh akan tetap stabil. He dan Hwang (2016) menyatakan bahwa *biopolymer* seperti kiotsan memiliki sifat biodegradabilitas dan biokompabilitas yang baik. Sifat biokompabilitas didapatkan karena biopolimer kitosan dapat mengadakan interaksi ionik dengan asam sialat pada membran usus sehingga cocok dijadikan penghantar obat dengan aplikasi per oral. Sifat biodegradabilitas kitosan menguntungkan bagi tubuh karena meminimalisir tingkat ketoksikan pada dosis terapi. Kusuma dkk. (2019) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun mimba juga menghasilkan senyawa toksik berupa *azadirachtin*, nimbin, nimbidin, dan salannin. Penelitian yang dilakukan oleh Merdana dkk. (2020) menyatakan bahwa *aadirachtin* menimbulkan efek antagonis hormon pertumbuhan, menimbulkan efek *antifeedant*, dan dapat menyebabkan gangguan sistem saraf.

Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini adalah pemberian sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) berpotensi memengaruhi struktur histologis limpa tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) galur Wistar betina yang ditunjukkan dengan adanya perubahan ukuran pada diameter pulpa putih, diameter *germinal center*, luas pulpa putih, dan luas *germinal center*.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Dekan Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro yang telah mendanai penelitian ini melalui sumber selain APBN Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro tahun anggaran 2022 sesuai Surat

Tugas Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Nomor: 30191D/UN7.5.8.2/PG/2022 dengan Kepala Proyek Penelitian Erlalana Hansel Christian Sitepu.

Daftar Pustaka

- Abror, Y. K., Woelansari, E. D., dan Suhariyadi, S. (2018). Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap Jumlah Sel Makrofag Peritoneal pada Mencit yang Diinduksi Vaksin BCG. *Jurnal Teknologi Laboratorium*. 7(1): 8-14.
- Ali, S. A., Singh, G., and Datusalia, A. K. (2021). Potential Therapeutic Applications of Phytoconstituents as Immunomodulators: Pre-Clinical and Clinical Evidences. *Phytotherapy Research*. 35(7): 3702-3731.
- Anggarasari, Y. E., Luqman, M., Poernomo, B., dan Handijatno, D. (2014). Pengaruh Pemaparan Karbofuran terhadap Gambaran Diameter Pulpa Putih Limpa Mencit (*Mus musculus*). *Veterinaria*. 7(2): 25-37.
- Braga, L. R., Perez, L. M., Soazo, M. V., and Machado, F. (2019). Evaluation of The Antimicrobial, Antioxidant, and Phsycochemical Properties of Poly (Vinyl Chloride) Films Containing Quercetin and Silver Nanoparticles. *LWT-Food Sciences and Technology Elsevier*. 101: 491-498.
- Carmelita, A. B. (2016). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) Secara Oral pada Mencit Balb-C terhadap Pencegahan Penurunan Diameter Germinal Center pada Kelenjar Getah Bening Serta Kadar IgM Serum. *J Biosains Pascasarjana*. 18(1): 1-12.
- Dewi, N.K.L., Jamhari, M., dan Isnainar, I. (2017). Kajian Pemanfaatan Tanaman Sebagai Obat Tradisional di Desa Tolai Kecamatan Torue Kabupatenparigimoutong. *E-Jip Biol*. 5(2): 57-65
- Dewi, P., Widyanarti, S., dan Rifai, M. (2013). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol *Annona muricata* Linn terhadap Peningkatan Jumlah Sel CD4⁺ dan CD8⁺ pada Timus Mencit (*Mus musculus*). *Biotropika*. 2(5): 269-272.
- Ernis, G., Notriawan, D., Fitriani, D., Yunita, E., dan Cantika, I. (2021). Uji In Vitro Aktivitas Imunomodulator Minyak Atsiri Serai Dapur (*Cymbopogon citratus*) terhadap Proliferasi Sel Limfosit Mencit. *Bioedusains: Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains*. 4(2): 129-135.
- Fathir, A., dan Rifa'i, M. (2014). Aktivitas Ekstrak Daun Kelor terhadap Sel-T Helper dan Sel-T Sitotoksik pada Mencit yang Diinfeksi *Salmonella thypi*. *Jurnal Veteriner*. 15(1): 114-122.
- He, X., and Hwang, H. M. (2016). Nanotechnology in Food Science: Functionality, Applicability and Safety Assessment. *J Food Drug Anal*. 24(4): 671-681.
- Kotala, S., dan Kurnia, T. S. (2022). Eksplorasi Tumbuhan Obat Berpotensi Imunomodulator di Kecamatan Leihitu Kabupaten Maluku Tengah. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*. 19(2): 186-200.
- Ku, C.M., and Lin, J. Y. 2013. Anti-Inflammatory Effects of 27 Selected Terpenoid Compounds Tested Through Modulating Th1/Th2 Cytokine Secretion Profiles Using Murine Primary Splenocytes. *Food Chemistry*. 141(2): 1104-1113.
- Kusuma, A. B., Saraswati, T. R., dan Sitaswiwi, A. J. (2019). Efek Pemberian Daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap Diameter Hepatosit Tikus (*Rattus norvegicus*). *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*. 21(2): 106-113.
- Makiyah, S. N. N., dan Wardhani, U. H. (2017). Potensi Ekstrak Etanol Buah *Citrullus lanatus* sebagai Agen Imunosupresi Melalui Pengamatan Histologi Limpa Mencit BALB/c. *Majalah Kedokteran Bandung*. 49(4): 245-251.
- Makiyah, S. N. N., Iszamriach, R., dan Nofariyandi, A. (2014). Paparan Ultraviolet C Meningkatkan Diameter Pulpa Alba Limpa dan Indeks Mitotik

- Epidermis Kulit Mencit. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 28(1): 17-21.
- Matheos, C. (2014). Gambaran Histologik Jaringan Limpa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Eschericia coli* dan Diberi Madu. *Ebiomedik*. 1(2): 961-965.
- Meliana, N. (2016). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (*Eleuthrine palmifolia* L.) Secara Oral pada Mencit BALB/C terhadap Pencegahan Penurunan Jumlah NK Sel Dan CD 8⁺. *J Biosains Pascasarjana*. 18(1): 13-23.
- Merdana, I. M., Hapsari, I. A. P., dan Muslih, F. (2020). Efektivitas Ekstrak Ethanol Daun Mimba terhadap *Rhipichepalus sanguineus* secara in Vitro. *Buletin Veteriner Udayana*. 12(1): 86-91.
- Mescher, A. L. (2012). *Histologi Dasar Junquiera Teks & Atlas*. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hlm. 221-239.
- Mozafari, M. R. M., Danaei, M., Dehghankhold, S. A., Davarani, F. H., Javanmard, R., Dokhani, A., and Khorasani, S. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on The Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceuticals*. 5:1-23.
- Muslihin, A. M., Astuti, R. A., dan Irwandi, I. (2022). Analisis Aktivitas Antioksidan Fraksi Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dengan Metode DPPH. *Jurnal Etnofarmasi*. 1: 1-7.
- Nata, I. D. G. A. T., Linawati, N. M., Ratnayanti, I. G. A. D., dan Wayan, I. (2021). Efek Pemberian Teh Kombinasi Bunga *Euphorbia Mili* dan Propolis Terhadap Diameter Pulpa Putih Limpa Tikus Wistar Jantan. *Jurnal Medika Udayana*. 10:5.
- Perdana, P. R. (2022). Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus Niruri* L.). *Jurnal Farmagazine*. 9(1): 50-54.
- Puspitaningrum, I., Kusmita, L., dan Franyoto, Y. D. (2017). Aktivitas Imunomodulator Fraksi Etil Asetat Daun Som Jawa (*Talinum triangulare* (Jacq.) Willd) terhadap Respon Imun Non Spesifik. *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*. 14(1): 24-29.
- Putri, F. M., Sitaswi, A. J., Isdadiyanto, S., dan Mardiaty, S. M. (2023). Profil Leukosit Tikus Jantan (*Rattus norvegicus* L.) Galur Sprague Dawley Setelah Paparan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Jurnal Sain Veteriner*. 41(1): 31-36.
- Renda, G., Gökkaya, İ., and Şöhretoğlu, D. (2021). Immunomodulatory Properties of Triterpenes. *Phytochemistry Reviews*. 22(18): 1-27.
- Rosnizar, R., Eriani, K., Ramli, I. M., dan Muliani, F. (2018). Uji Efek Imunostimulan Buah Kurma (*Phoenix dactylifera*) pada Mencit Jantan (*Mus musculus*) Galur BALB/C. In *Prosiding Seminar Nasional Biotik*. 3(1): 292-297.
- Rosyanti, L., dan Hadi, I. (2020). Respon Imunitas dan Badai Sitokin Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2 Literatur Review. *Jurnal Kesehatan Madani Medika*. 11(02): 176–201.
- Rousdy, D. W., Rahmawati, K. R., dan Kuniadi, E. (2017). Mikroanatomi Limpa Tikus (*Rattus norvegicus* L.) Setelah Pemberian Asam Humat dari Tanah Gambut Kalimantan. *J Penelitian dan Pengembangan Borneo Akcaya*. 4(1): 57-62.
- Sarkar, S., Singh, R. P., and Bhattacharya, G. (2021). Exploring The Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Its Active Compound in The Regulation of Biological Pathways: An Update on Molecular Approach. *3 Biotech Springer*. 11(4): 178.
- Setiawan, H., Wulandari, S. W., dan Fitriyani, A. N. (2021). Potensi Imunomodulator Herbal Ekstrak Etanol Daun Pepaya Varietas Calina terhadap Struktur Jaringan Limpa Tikus Putih Galur Wistar. *Jurnal Veteriner*. 22(4): 531-539.
- Sholikhah, A. R., dan Rahayuningsih, H. M. (2015). Pengaruh Ekstrak Lompong (*Colocasia esculenta* L. Schoot) 30 Menit

- Pengukusan terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar No (Nitrit Oksida) Mencit Balb/C Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nutrition College*. 4(2): 526–569.
- Sitasiwi, A. J., Isdadiyanto, S., dan Mardiaty, S. M. (2021). Formulasi dan Evaluasi Efek Antifertilitas Sediaan Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Mimba (SNEEDM) terhadap Penurunan Potensi Reproduksi Tikus Sprague Dawley Jantan. Laporan Kegiatan Penelitian FSM UNDIP. No.2173/UN.7.5.8.2/PP/2021.
- Sitasiwi, A. J., Isdadiyanto, S., dan Mardiaty, S. M. (2018). Effect of Ethanolic Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extract as an Herb Contraceptive on Hepatosomatic Index of the Male Mice (*Mus musculus*). *Journal of Physics. Conference Series*. 1-6.
- Sukmayadi, A. E., Sumiwi, S. A., Barliana, M. I., and Aryanti, A. D.. (2014). The Immunomodulatory Activity of Ethanol Extract of Tempuyung Leaves (*Sonchus arvensis* Linn.). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 1(2): 65-72.
- Swaroop, A. K., Lalitha, C. M. V. N., Shanmugam, M., Subramanian, G., Natarajan, J., and Selvaraj, J. (2022). Plant Derived Immunomodulators: A Critical Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 12(4): 712-729.
- Tasminatun, S., Pravitasari, R., dan Makiyah, N.. (2017). Potential Ethanol of *Carica papaya* L. Extract as Immunomodulatory Through Histology Observation at Mice Balb/C Spleen. *J Berkala Kedokteran*. 13(2): 205-210.
- Ulya, L. H., Ismail, A., dan Susilaningsih, N. (2016). Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun *Piper crocatum* Dosis Bertingkat terhadap Proliferasi Limfosit Limpa: Studi Pada Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. *Jurnal Kedokteran Diponegoro (Diponegoro Medical Journal)*. 5(4): 1192-1199.
- Yanuhar, U., Hartawan, G., Musa, M., Suryanto, H., Mahasri G., Supii, A., dan Caesar, N. (2023). Pengaruh Nanovaksin Berbasis Nanopartikel Hybrid Chitosan terhadap Sel Darah Ikan Kerapu Cantang Yang Diinfeksi VNN. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 28(4): 650-659.