

Struktur Histologi Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina setelah Paparan Sediaan Nanokitosan Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)

Histological Structure of the Liver of Female White Rats (*Rattus norvegicus*) after Exposure to Nanochitosan Preparations from Ethanol Extract of Neem Leaves (*Azadirachta indica* A. Juss)

Erlalana Hansel Christian Sitepu, Agung Janika Sitaswi^{*}, Teguh Suprihatin
Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro,
Jl. Prof. Jacob Rais, Tembalang, Semarang, 50275
^{*}Email: agssiwi@yahoo.co.id

Diterima 19 Maret 2024 / Disetujui 26 November 2024

ABSTRAK

Tanaman mimba merupakan tanaman herbal yang memiliki kandungan antioksidan tinggi dan berpotensi sebagai obat. Kendala dalam pemberian secara oral adalah rendahnya bioavailabilitas obat dan distribusi senyawa aktif tanaman herbal. Salah satu yang bisa dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan mengemas ekstrak tanaman herbal ke dalam bentuk partikel lebih kecil berukuran nano. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat respon struktur dan fungsi hepar tikus putih betina dengan pemberian sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba. Penelitian ini menggunakan 12 ekor tikus umur 2 bulan yang di bagi menjadi 3 perlakuan dengan 4 ulangan yaitu P0 (kelompok tikus normal yang di induksi dengan aquades 2ml), P1 (Tikus normal yang di induksi dengan ekstrak etanol daun mimba 2ml). P2 (tikus normal yang di induksi dengan nanokitosan : ekstrak etanol daun mimba 2:1). Desain penelitian menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Analisis data menggunakan software SPSS versi 24 dengan uji ANOVA taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa pemberian sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba 1:2 berpengaruh tidak nyata terhadap *Hepatosomatic index*, diameter hepatosit, namun hasil uji Kruskal Wallis yang dilanjutkan dengan uji Mann Whitney berpengaruh nyata terhadap skor kerusakan hepatosit ($P < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dapat mengantarkan senyawa bioaktif daun mimba ke organ target yaitu hepar serta dapat mengurangi kerusakan histologis hepar akibat senyawa toksik mimba.

Kata kunci: nanopartikel, hepatosit, indeks hepatosomatik

ABSTRACT

Neem are herbal plants that have high antioxidant content and have potential as medicine. Obstacles in oral administration are low bioavailability of medicines and distribution of active compounds of herbal plants. One that can be done to overcome this problem is by packaging herbal plant extracts into the form of smaller nano-sized particles. The purpose of this study was to see the response of the structure and function of female white rats by giving nanochitosan preparations of neem leaf ethanol extract. This study used 12 mice aged 2 months which were divided into 3 treatments, each treatment had 4 repeats, namely P0 (group of normal rats induced with 2 ml aquades), P1 (normal mice induced with 2 ml neem leaf ethanol extract). P2 (normal mice induced with 2 ml nanochitosan: neem leaf ethanol extract 2:1). The study design used RAL (Complete Randomized Design). Data analysis using SPSS software version 24 with ANOVA test significance level of 5% showed that administration of neem leaf ethanol extract nanochitosan preparation 1:2 had no real effect on hepatosomatic index, hepatocyte diameter, but the results of the Kruskal Wallis test followed by the Mann Whitney test had a real effect on hepatocyte damage score ($P < 0.05$), so it can be concluded that giving neem leaf ethanol extract nanochitosan preparations can delivering neem leaf bioactive compounds to the target organ, namely the liver and can minimize histological damage and liver function due to neem toxic compounds.

Keywords: Nanoparticle, hepatocytes, hepatosomatic index

PENDAHULUAN

Obat tradisional merupakan ramuan bahan alami berbahan dasar hewan, tumbuhan, mineral, dan campuran bahan tersebut yang digunakan dengan tujuan pengobatan berdasarkan pengalaman. Kemajuan penelitian dengan tujuan menemukan obat herbal berbahan tanaman terus meningkat. Tanaman sering digunakan sebagai bahan obat herbal karena dianggap lebih aman. Takoy *et al.*, (2013) mengungkapkan bahwa banyak tanaman dengan potensi sebagai obat tradisional dan lebih dari seribu jenis terdapat di Indonesia. Mimba adalah salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat herbal karena memiliki potensi sebagai antikanker, antivirus, antioksidan, antijamur, dan antiinflamasi (Gupta *et al.*, 2017).

Uji fitokimia menunjukkan bahwa mimba mengandung senyawa utama seperti karbohidrat, protein, dan turunan lemak, sedangkan metabolit sekunder seperti fenol, flavonoid, saponin, steroid, alkaloid, asam amino, dan tannin (Al-Hashemi & Hossain, 2016). Kandungan flavonoid pada mimba memiliki kemampuan sebagai antioksidan dengan daya tangkap radikal bebas tinggi dan dapat meregenerasi sel yang rusak. Senyawa fenol pada mimba, memiliki aktivitas antioksidan dan berpotensi sebagai antikanker (Susmitha *et al.*, 2013). Mimba selain mengandung khasiat yang baik, juga memiliki kandungan senyawa toksik yang dapat menyebabkan efek samping pada metabolisme tubuh seperti azadirachtin dan nimbidin (Javandira, 2016).

Pengaplikasian obat herbal lebih baik dilakukan menggunakan nanopartikel karena akan menurunkan efek pada jaringan non-target (Estuningtyas, 2018). Nanopartikel memiliki ukuran 10-10.000 nm sehingga dapat digunakan untuk menghantarkan obat dan meningkatkan bioavailabilitas. Nanopartikel juga memiliki manfaat untuk meningkatkan stabilitas zat aktif dan mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran pencernaan (Moharaj & Chen, 2006). Partikel yang berukuran nano dapat menembus pembatas antara darah dan jaringan sehingga meningkatkan efektivitas obat pada jaringan. Penelitian yang

dilakukan oleh Ohta *et al.*, (2020) mengemukakan bahwa nanopartikel dapat menembus *blood-barrier* sehingga lebih tepat dalam targeting organ.

Paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba terhadap hepar tikus jantan menunjukkan kerusakan hepar yang minim (Simbolon *et al.*, 2022). Tikus jantan dan betina memiliki perbedaan secara fisiologis seperti bobot badan dan bobot organ yang berpengaruh pada perbedaan kecepatan metabolisme tubuh (Schweinfurth, 2020). Tikus betina juga mengalami siklus estrus yang berpengaruh pada homeostasis tubuh sehingga dapat ditemukan adanya perbedaan respon terhadap penyerapan suatu zat (Sportnitz dkk. 1999).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui struktur histologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina setelah paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan selama 6 minggu. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Rancangan Penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 4 ulangan. Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah hewan uji berupa 12 ekor tikus betina galur Wistar yang diporeleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Laboratorium. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah nilai HSI (*Hepatosomatic Index*), diameter hepatosit, dan skoring kerusakan jaringan hepar setelah 21 hari perlakuan

Persiapan Kandang

Kandang yang digunakan untuk penelitian berukuran 25 cm x 30 cm x 15 cm (lebar x panjang x tinggi), tempat minum dan pakan penelitian dibersihkan menggunakan sabun dan dikeringkan. Kandang kering diberi sekam,

wadah pakan, dan minum ditempatkan di dalam kandang kemudian kandang ditutup rapat.

Ekstraksi Etanol Daun Mimba

Simplisia daun mimba diekstraksi dengan metode maserasi yang dilakukan di Laboratorium Cendekia Nanotech Utama Semarang. 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 (dibuat sesuai metode Sitasiwi *et al.*, 2017).

Persiapan Hewan Uji

Hewan uji diaklimasi selama 7 hari. Selama aklimatisasi, tikus diberi makan dan minum *ad libitum*, diperlihara dengan suhu lingkungan kandang 26°C dan kelembaban 75%. Tikus dengan berat badan seragam kemudian dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dengan 4 ekor tikus sebagai ulangan. Penimbangan tikus Wistar dilakukan pada akhir aklimasi. Pemberian Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Mimba (SNEEDM) melalui oral dengan volume 2 ml/ekor/hari. Bahan uji diberikan selama 21 hari. Perlakuan kelompok hewan uji sebagai berikut :

- P0 : kontrol
- P1 : paparan ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB),
- P2 : paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB).

Perhitungan Diameter Hepatosit

Hepar dibuat sediaan histologis dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksin Eosin dengan ketebalan sayatan 5 μ . Pengamatan hepar dilakukan menggunakan mikroskop pada perbesaran 40x. Struktur

hepar sebagian besar disusun oleh sel hepatosit (Ozturk *et al.*, 2015). Perhitungan diameter hepatosit dilakukan pada setiap sediaan histologis hepar.

Skoring Kerusakan Hepar

Pengamatan kerusakan sel hepatosit pada hepar dilakukan dengan mengamati sediaan histologi hepar pewarnaan hematoksin-eosin menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada tiga bidang pandang. Pengamatan dilakukan menggunakan bantuan optilab yang disambungkan ke laptop. Setiap bidang pandang dihitungi delapan sel hepatosit. Setiap bidang pandang diamati sel sehat dan nekrosis pada hepatosit.

Analisis Data

Data numerik hepatosomatik indeks dan diameter hepatosit diuji normalitas dan homogenitasnya. Hasil uji normalitas dan homogenitas normal dan homogen maka uji dilanjutkan menggunakan *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji ANOVA menunjukkan berbeda tidak nyata. Data pengamatan skor kerusakan hepatosit dianalisis secara deskriptif dengan skoring sesuai metode Restuati dan Nasution (2019) dan diuji *non parametrik* yaitu *Kruskal Wallis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji ANOVA paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba terhadap HSI (Indeks Hepatosomatik) menunjukkan perbedaan tidak nyata (Tabel 1). Penelitian Hasana *et al.*, (2019) menyatakan bahwa pemberian perlakuan ekstrak etanol daun mimba pada dosis sama atau lebih rendah dari 14 mg/kgBB belum memberikan pengaruh terhadap nilai indeks hepatosomatik mencit. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian tersebut sehingga diduga ekstrak etanol daun mimba dapat didetoksifikasi dengan baik oleh hepar.

Hasil uji ANOVA yang dilakukan untuk melihat perbedaan antar-kelompok perlakuan pada parameter diameter sel hepatosit

menunjukkan berbeda tidak nyata antara perlakuan P0, P1, dan P2 (Tabel1). Fazelpour *et al.*, (2008) menyatakan bahwa ukuran diameter hepatosit tikus normal berada pada kisaran 12-30 μm . Hasil uji menunjukkan kelompok P1 memiliki rata-rata diameter tertinggi dengan nilai $15,62 \pm 0,25$ dan masih tergolong normal. Hasil pengukuran diameter hepatosit menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun mimba tidak memengaruhi diameter sel hepatosit. Hal tersebut diduga disebabkan karena dosis yang diberikan pada perlakuan masih dalam dosis aman. Kusuma *et al.*, (2019) menyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol daun mimba dengan dosis kurang dari 20 mg/ekor/hari tidak

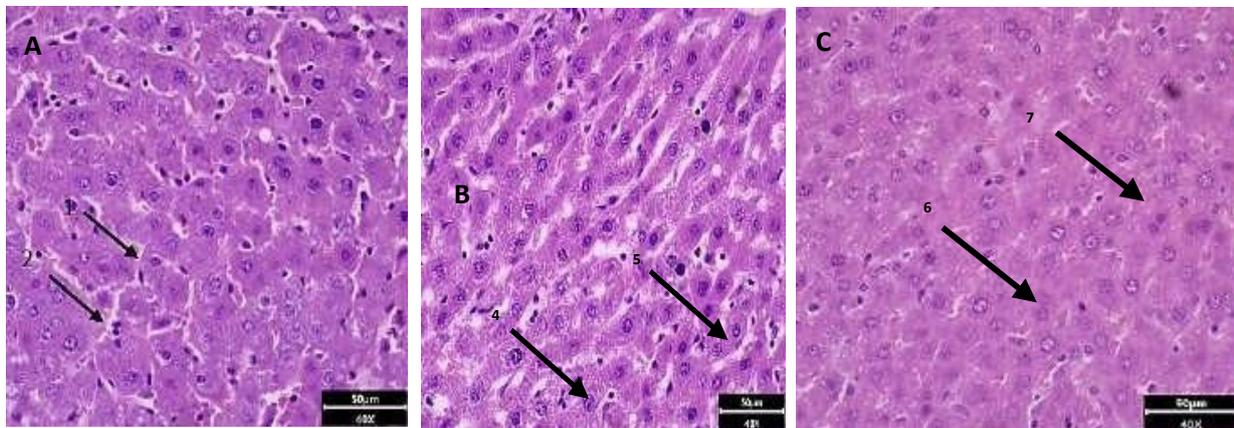
menyebabkan kerusakan hepatosit. Penelitian Sitasiwi (2018) menyatakan bahwa hepar tikus memiliki kemampuan untuk mendetoksifikasi zat toksik hasil perlakuan pemberian ekstrak etanol daun mimba hingga dosis 30 mg/ekor/hari pada tikus.

Hasil analisis uji Kruskal-Wallis menunjukkan berbeda nyata terhadap skoring kerusakan hepatosit (Tabel1). Uji Mann-Whitney dilakukan untuk melihat perbedaan antar-kelompok perlakuan parameter skor kerusakan hepatosit. Hasil uji Mann-Whitney menunjukkan beda nyata antara P0 dengan P1 dan P1 dengan P2. Gambaran kerusakan histologi hepar tikus dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Indeks hepatosomatik, diameter hepatosit, dan skoring kerusakan hepatosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar setelah paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba

	P0	P1	P2
Indeks hepatosomatik	$3,83 \pm 0,02$	$3,86 \pm 0,09$	$3,84 \pm 0,02$
Diameter hepatosit (μm)	$15,59 \pm 0,30$	$15,62 \pm 0,25$	$15,60 \pm 0,22$
Skoring kerusakan hepatosit	$1,80 \pm 0,40^a$	$3,14 \pm 0,34^b$	$1,74 \pm 0,44^a$

Keterangan: Rerata yang diikuti superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$). Data yang ditampilkan adalah mean \pm SD



Gambar 1. Histologi hepar tikus setelah paparan selama 21 hari. (A) Sediaan histologis hepar P0, (B) Sediaan histologis hepar P1, (C) Sediaan histologis P2

Keterangan: 1. Sel hepar normal, 2. Sinusoid normal. 3. Sinusoid yang melebar, 4. Hepatosit bengkak keruh, 5. Nekrosis, 6. Sel hepar normal, 7. Sinusoid normal

Faktor yang diduga menyebabkan nilai indeks hepatosomatik berbeda tidak nyata adalah pemberian paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba pada dosis pemberian masih dapat dimetabolisme dengan baik oleh hepar.

Hasana *et al* (2019) menyatakan bahwa zat toksik yang masih dapat dimetabolisme dengan baik oleh hepar belum memberi efek pada metabolisme nutrisi sehingga nilai indeks hepatosomatik tidak berbeda nyata. Wicaksono *et*

al. (2023) menyatakan bahwa tingkat perubahan bobot organ dan bobot tubuh sangat berkaitan dengan pakan yang dikonsumsi, kesehatan, stress, dan keberadaan zat toksik. Ashwini *et al.* (2016) menyatakan bahwa nilai indeks hepatosomatik berkaitan dengan fungsi hepar sebagai cadangan energi dan kegiatan metabolisme.

Penyediaan energi pada hepar dilakukan dengan proses glukoneogenesis. Chourpiliadis & Mohiuddin (2023) menyatakan bahwa glukoneogenesis adalah sekelompok reaksi metabolisme untuk menjaga tingkat energi (suplai glukosa) yang memadai, agar tubuh dapat berfungsi dengan baik. Hepar menyimpan sumber utama glukosa sebagai glikogen, tetapi saat glikogen habis tubuh dapat menggunakan asam laktat, gliserol, dan asam lemak sebagai sumber glukosa penyedia energi bagi tubuh. Darah merah dan jaringan yang kekurangan mitokondria dan otot untuk mendukung metabolisme anaerob, glukosa yang diterima diubah menjadi piruvat dan menjadi asam laktat. Asam laktat kemudian disekresikan dalam plasma dan diambil oleh hati untuk diubah menjadi glukosa melalui redoks dengan katalis laktat dehidrogenase. Hasil penelitian Seriana *et al.* (2021), menunjukkan bahwa mimba tidak mempengaruhi konsentrasi alanin aminotransferase dan aspartat aminotransferase dimana enzim ini berpengaruh terhadap gluconeogenesis yang menyediakan energi pada hepar.

Pembengkakan pada sel hepar diduga terjadi karena vakuola pada sel hepar yang menjadi tempat akumulasi hasil metabolisme. Saraswati *et al.* (2013) menyatakan bahwa hasil metabolisme disimpan pada vakuola sel hepatosit. Wahyuningtyas *et al.* (2018), menyatakan pembengkakan hepatosit tidak dapat menjadi indikator kerusakan permanen karena hepar memiliki kemampuan regenerasi yang tinggi. Reaksi pemulihan regenerasi sel pada hepar memungkinkan hepar untuk kembali seperti keadaan semula sehingga perlakuan tidak berpengaruh pada kerusakan hepar.

Sediaan nanopartikel terbukti mampu mengantarkan senyawa aktif daun mimba ke

target yang ditunjukkan dari stabilnya ukuran diameter hepatosit P2. Stabilnya ukuran diameter sel hepatosit diakibatkan zat toksik azadirachtin pada mimba tidak merusak sel hepatosit karena dilindungi oleh senyawa aktif mimba. Putri *et al.* (2023) menyatakan bahwa uji fitokimia pada ekstrak etanol daun mimba positif mengandung senyawa fenolik, alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin, dan saponin. Senyawa aktif seperti flavonoid berperan sebagai antioksidan dan melindungi sel hepatosit dari ROS akibat paparan zat toksik. Ezz-din *et al.*, (2011) menyatakan bahwa daun mimba memiliki kemampuan untuk membantu regenerasi sel hepar kembali menjadi normal. Hepar mampu melakukan regenerasi pada hepatosit dengan meningkatkan kecepatan mitosis hepatosit dan meningkatkan differensiasi sel punca ekstrahepatik (Esrefuglo, 2013). Penelitian Safithri (2018), menunjukkan bahwa hepar tikus pasca hepatektomi 2/3 bagian dapat tumbuh hingga massanya kembali normal setelah sepuluh hari. Proses regenerasi tersebut melibatkan 70-90% hepatosit yang minimal mengalami satu kali pembelahan sel dengan rata-rata 1,4 kali mitosis untuk mengembalikan ukuran normal hati.

Berdasarkan hasil uji Kruskal-Wallis, kelompok P0 tidak berbeda nyata dengan kelompok P2 tetapi berbeda nyata dengan kelompok P1. Rerata skoring kerusakan pada sel hepatosit kelompok P0 berada di angka 1 yang berarti terdapat 1-10% kerusakan sel hepatosit. P0 menunjukkan nilai skoring yang rendah karena merupakan kelompok kontrol yang diinduksi oleh akuades. Sel hepatosit pada kelompok P0 menunjukkan kondisi yang baik, tidak ada pembengkakan, dan sinusoid terlihat normal. Janquiera & Carnerio (2012) menyatakan bahwa jaringan hepar yang sehat ditunjukkan oleh sel hepatosit yang tersusun rapi dan ukuran sel seragam.

Skor kerusakan tertinggi ditunjukkan pada perlakuan P1 dengan nilai $3,14 \pm 0,34$. Skor kerusakan yang tinggi pada P1 diakibatkan zat non toksik pada P1 seperti flavonoid memiliki molekul yang lebih besar dan kompleks sehingga lebih sulit untuk diserap usus dibandingkan zat toksik. PubChem (2024) menyatakan bahwa

saponin memiliki ukuran permukaan 158 Å² dan tingkat kompleksitas 1200 dibandingkan dengan flavonoid (quercetin) dengan ukuran molekul 454 Å² dan kompleksitas 2260. Perbedaan ukuran tersebut menyebabkan zat toksik lebih mudah diserap oleh usus dan memberi dampak pada hepar dibandingkan dengan zat non-toksik.

Perlakuan P2 yang menggunakan nanokitosan menunjukkan skor kerusakan yang rendah. Kerusakan yang rendah pada P2 diakibatkan karena nanopartikel meningkatkan bioavailabilitas zat non-toksik pada mimba yang berukuran lebih besar sehingga mengurangi dampak kerusakan zat toksik. Hanutami & Budiman (2018) menyatakan bahwa teknologi nano meningkatkan bioavailabilitas dan absorpsi bahan aktif. Penelitian Mohanraj & Chen, 2006 mengungkapkan bahwa nanopartikel meningkatkan bioavailabilitas dari berbagai zat sehingga mudah diserap oleh tubuh. Penelitian Fitri *et al.* (2020) menunjukkan bahwa nanopartikel meningkatkan bioavailabilitas dengan menurunkan ukuran partikel seperti flavonoid hingga berukuran < 300 nm.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba tidak merusak struktur dan fungsi hepar dilihat dari nilai hepatosomatic indeks, diameter hepatosit dan skoring kerusakan hepar.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti menyampaikan terimakasih 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/PG/2022.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Hashemi, Z. S. S., M. A. Hossain. 2016. Biological activities of different neem leaf crude extracts used locally in Ayurvedic

medicine. *Natural Science and Engineering*. 8(12) : 128-131.

Ashwini,L., S. Benakappa, H. N. Anjanayapna, L. Akshay. 2016. Observation on the Ganodosomatik Indeks-GSI and Hepatosomatic index- HIS of *Decapterus russelli* mangaluru Coast. *International Journal of Engineering Science and Computing*. 6(6) : 7396-7399.

Chourpiliadis, C., S.S. Mohiuddin. 2023. Biochemistry, Gluconeogenesis. . Treasure island (FL).

StatPearls Publishing.

Estuningtyas, A., S. Widiyari, K. Kusmardi. 2018. Acute Toxicity of Chitosan Nanoparticles Containing Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Leaf Extract and Anti-Inflammatory Effect in Dextran Sodium Sulfate-Induced Mouse Model of Ulcerative Colitis. *J. App Pharm*. 10. Spesial Issue 1.

Fitri, D., Naelaz, Z., W. Kiromah, T. C. Widiastuti. 2020., Formulasi Dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) Pada Berbagai Variasi Komposisi Kitosan Dengan Metode Gelasi Ionik. *Journal of pharmaceutical Science and Clinical research*. 1(1) : 61-69.

Gupta S.C., S. Prasad, A.K. Tyagib, A.B. Kunnumakkarac, B.B. Aggarwal. 2017. Neem an indian traditional panacea with modern molecular basis. *Journal of Phytomedicine*. 34(1) : 14-20.

Hanutami, B., A. Budiman. 2018. Penggunaan Teknologi Nano pada Obat Herbal. *Farmaka*. 15(2) : 29-41.

Hasana, A. N., A. J. Sitaswi, S. Isdadiyanto. 2019. Hepatosomatik Indeks dan Diameter Hepatosit Mencit (*Mus musculus* L.) Betina setelah Paparan Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta Indica* A. Juss). *Jurnal Pro-Life* 6(1) : 1-12.

Mohanraj, V.J., Y. Chen. 2006. Nanoparticles : A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5 :1.

Ohta, S., E. Kikuchi, A. Ishjima, T. Azuma, I. Sakuma, T. Ito. 2020. Investigating the Optimum Size of Nanoparticles for their delivery into the brain assisted by focused ultrasound-induced blood- brain barrier opening. *Nature Scientific Reports*. (1)10 : 18-22.

Putri, F. M., A. J. Sitaswi, S. Isdadiyanto, S. M. Mardiati. 2023. Profil Leukosit Tikus

- Jantan (*Rattus norvegicus* L.) Galur Sprague Dawley setelah Paparan Nanokitosan Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Jurnal Sain Veteriner*. 41(1):29-36
- Restuati, M., P. A. Nasution. 2019. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Buasbuas (*Premna pubescens* Blume) Terhadap Gambaran Histopatologi Hati pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Kanker 7, 12 Dimethylbenz antrasena (DMBA). *Jurnal Biosains*. 5(2) : 76-82.
- Safthri, F. 2018. Mekanisme Regenerasi Hati secara Endogen pada Fibrosis Hati. *Jurnal Fakultas Kedokteran Muhammadiyah Malang*. 2(4) : 9-26.
- Schweinfurth, M.K., 2020. The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Article in eLife Sciences*, Vol.9
- Seriana, I., M. Akmal, D. Darusman, S. Wahyuni, K. Khairan, S. Sugito. 2021. NeemLeaf (*Azadirachta indica* A. Juss) Ethanolic Extract on the Liver and Kidney Function of Rats. *The Scientific World Journal*. 1-7
- Simbolon, J. E., A. J. Sitaswi, Isdadiyanto. 2022. The Effect of Nanochitosan Preparation of Neem Leaf (*Azadirachta indica*) Ethanol Extract on the Liver Structure of White Rats (*Rattus norvegicus*). *IJHES*. 5(6) : 21-31.
- Sitaswi, A., J., S. Isdadiyanto, S. M. Muflichatun. 2017. The estradiol 17- β concentration in mice after treated with ethanolic leaf extract of *Azadirachta indica* (neem). AIP Conference Proceedings. 1844-020014; <https://doi.org/10.1063/1.4983425>.
- Sitaswi, A. J., W. T. Artama, A. Budiyanto, E. Dharmana, 2016. Pelacakan Protein Wnt4 pada Uterus Mencit Swiss Webster. *Jurnal Veteriner*. 17 (1): 22-29.
- Sitaswi, A. J. 2018. Bobot Badan Mencit (*Mus-musculus* L) setelah pemberian Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) Secara Oral Selama 21 hari. *Journal of Buletin and Fisiologi*. 3(1) : 1-7.
- Sportnitz, U.M., C.D. Socin, A.A. Dravid. 1999. Estrous Stage Determination in Rats by Means of Scanning Electron Microscopic Images of Uterine Surface Epithelium. *The Anatomical Records*. 254:116-126.
- Susmitha, Sudevan, K.K. Vadyamol, Ranganayaki, P. R. Vijayaragavan. 2013. Phytochemical extraction and antimicrobial properties of *azadirachta indica* (neem). *Global Journal of Pharmacology*. 7(3) : 316-320.
- Wahyuningtyas, P., A. J. Sitaswi., S. M. Mardiaty. 2018. *Hepatosomatic Index* (HIS) dan Diameter Hepatosit Mencit (*Mus musculus* L.) setelah Paparan Ekstrak Air Biji Pepaya (*Carica papaya* L.). *Jurnal Biologi*. 7(1) : 8-17.
- Wicaksono, A. R., S. M. Mardiaty, S. Isdadiyanto. 2023. Pemberian Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) Terhadap Struktur Histopatologi Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Jantan Hiperglikemia. *Buletin Anatomi dan Fisiologis*. 8(1) : 53-60.