

Profil Leukosit Tikus Jantan (*Rattus novergicus* L.) Galur Sprague Dawley setelah Paparan Nanokitosan Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.)

Leukocyte Profiles of Male Rat (*Rattus novergicus* L.) Sprague Dawley Strain After Exposure to Nanochitosan Ethanolic Extract of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) Leaf

Fauziah Mustika Putri, Agung Janika Sitasiwi*, Sri Isdadiyanto, Siti Muflichatun Mardati

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, 50275

*Email: agssiw@yaho.co.id

Diterima : 2 Juli 2022, direvisi : 31 Januari 2023, disetujui : 7 Februari 2023

Abstract

Neem (*A. indica*) leaf extract has antioxidant activity that provides a broad therapeutic effect. In vivo research based on bio-nanomaterials is widely used as drug delivery to increase the bioavailability of drugs while in the systemic circulation. The combination of nanoparticles and neem leaf extract needs to be known for its safety levels for the body. The purpose of this study was to determine the effect of nanochitosan from neem leaf ethanolic extract on the leukocyte profiles of male Sprague Dawley rats as indicated by the total and differential leukocyte counts. This study used a Complete Randomized Design with 4 male rats from 4 treatment groups consisting of P0 (aquadest), P1 (chitosan nanoparticle solution), P2 (NEEDM: Nanochitosan Ekstrak Etanol Daun Mimba 50%), P3 (NEEDM 100%). The treatment was given orally for 28 days. Nanochitosan were synthesized using the ionic gelation method and succeeded in obtaining nano sizes, based on Sitasiwi et al. (2021) method. The variables observed were the total and differential leukocyte counts. Data were analyzed by Statistical Product and Service Solution (SPSS). The results showed that there was no significant difference between the treatment groups ($P>0.05$). The total leukocyte count, and the mean number of lymphocytes, monocytes, and segment neutrophils were within the normal range. Based on the results of the study, it was concluded that the administration of nanochitosan of neem leaf extract had no effects against leucocyte profiles.

Key words: leukocyte ; ionic gelation; nanoparticle; neem leaf; white rat

Abstrak

Ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) memiliki aktivitas antioksidan yang memberikan efek terapeutik luas. Penelitian *in vivo* berbasis bio-nanomaterial banyak digunakan sebagai *drug delivery* untuk meningkatkan ketersediaan hayati pada obat selama berada di sirkulasi sistemik. Kombinasi antara nanopartikel dan ekstrak daun mimba perlu diketahui kadar keamanannya bagi tubuh. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh nanokitosan ekstrak etanol daun mimba terhadap profil leukosit tikus jantan galur *Sprague Dawley* jantan yang ditunjukkan dengan jumlah total dan diferensial leukosit. Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 ekor tikus jantan dari 4 kelompok perlakuan terdiri dari P0 (akuades), P1 (larutan nanopartikel kitosan), P2 (NEEDM: Nanokitosan Ekstrak Etanol Daun Mimba, 50%), P3 (NEEDM 100%). Pemberian perlakuan diberikan secara oral selama 28 hari. Sintesis nanopartikel kitosan menggunakan metode gelasi ionik sesuai metode Sitasiwi dkk. (2021). Variabel yang diamati yaitu jumlah total dan diferensial leukosit. Data dianalisis dengan *Statistical Product and Service Solution* (SPSS). Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan secara nyata antar kelompok perlakuan ($P>0,05$). Jumlah total

leukosit, dan jumlah rataan limfosit, monosit, dan neutrofil segmen masih dalam kisaran normal. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa pemberian sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol daun mimba tidak mempengaruhi profil leukosit tikus.

Kata kunci: leukosit; gelasi ionik, nanopartikel, daun mimba, tikus putih

Pendahuluan

Senyawa bioaktif yang diisolasi dari berbagai bagian pohon mimba menunjukkan potensi terapeutik yang luas, antara lain sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikanker, anti-angiogenesis, dan agen imunomodulator (Sarkar *et al.*, 2021). Daun mimba yang diekstraksi dengan *methanol* mengandung beberapa senyawa bioaktif yaitu flavonoid, tannin, saponin, dan terpenoid. Senyawa bioaktif tersebut bertindak sebagai antioksidan yang menangkalkan radikal bebas (Supriyatno *et al.*, 2017).

Penelitian secara *in vivo* yang dilakukan oleh Braga *et al.* (2021) selama 2 hari dengan cara penyuntikan intramuskular hewan dengan konsentrasi ekstrak quercetin 2% menunjukkan nilai LD₅₀ masing-masing 6,2 dan 9,4 mL/kg dan menimbulkan toksisitas akut saat disuntikkan pada tikus. Ekstrak mimba atau subproduk dari senyawa bioaktif mimba tidak bersifat toksik jika diberikan secara oral. Sifat akut toksik ekstrak mimba hanya ditunjukkan oleh hewan coba yang diinjeksi secara intramuskular atau melalui jalur intraperitoneal. Efektivitas dari senyawa bioaktif daun mimba saat ini telah diselidiki namun hanya pada tingkat praklinis, sedangkan efek fitokimia ini pada manusia sebagian besar belum diselidiki (Paul *et al.*, 2011). Hasil penelitian *in vivo*, Khandia *et al.* (2015) menyatakan bahwa aplikasi nanopartikel silver daun mimba dapat mereduksi viabilitas pembuluh darah dari membran *chorioallantoic* dalam perkembangan embrio telur ayam, yang menyebabkan kematian pada embrio. Keamanan ekstrak *A. indica* maupun senyawa yang diisolasi harus dievaluasi, terutama menggunakan hewan model dari kelas mamalia (Braga *et al.*, 2021).

Pemberian obat secara oral memiliki kekurangan, diantaranya disebabkan oleh bioavailabilitas obat yang rendah dan distribusi senyawa mimba yang rendah ke tubuh. Menurut penelitian Ajazuddin & Saraf (2010), solusi untuk mengatasi masalah pemberian obat secara oral adalah dengan menyiapkan obat dalam bentuk

nanokitosan untuk mempermudah penyerapan dan pendistribusian obat ke dalam tubuh serta meningkatkan bioavailabilitas tanaman mimba. Prasetiowati *et al.* (2018) menyatakan bahwa kelebihan penggunaan nanokitosan pada ekstrak tumbuhan obat dapat memperlancar penyerapan dan distribusi obat ke dalam tubuh serta mengurangi efek toksik obat. Polimer yang digunakan dalam pembuatan nanopartikel adalah kitosan dengan senyawa yang larut dalam natrium tripolifosfat (NaTPP) (Kafshgari *et al.* 2011). Martien *et al.* (2012) menyatakan bahwa kitosan dapat mengurangi efek toksik dari paparan mimba, sehingga sangat efisien untuk dikembangkan sebagai bahan utama pembuatan nanopartikel. Oleh karena itu, nanopartikel dapat memberikan solusi yang efektif untuk mengatasi sulitnya penghantaran obat ke dalam tubuh, memperlancar distribusi senyawa bioaktif dari tanaman mimba ke sirkulasi sistemik dan mengurangi efek toksik tanaman mimba. Nanopartikel kitosan telah banyak digunakan dalam bidang medis baik dalam bentuk nanoemulsi, *nanocarrier*, maupun nanoliposom. Penggunaan senyawa bioaktif daun mimba juga berpotensi dalam mempertahankan sistem imun selama berada dalam kisaran dosis yang aman. Sistem penghantaran obat *route* oral dapat dikatakan berhasil apabila obat dapat masuk ke dalam sirkulasi sistemik dan mencapai reseptor target yang sesuai. *Route* oral akan melalui jalur dan saluran pencernaan sehingga akan menjadi kurang tepat bila dikirim langsung dalam bentuk bebas (Aguirre, 2016). Aplikasi nanopartikel dalam menghantarkan obat (*drug delivery*), yang dalam hal ini digunakan untuk membawa senyawa aktif dalam ekstrak etanol daun mimba, perlu diketahui tingkat keamanannya dalam tubuh dengan mengamati jumlah total dan diferensial leukosit.

Materi dan Metode

Bahan-bahan yang digunakan adalah sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba yang

disintesis dengan metode gelas ionic, sesuai metode Sitasiwi dkk. (2021), pakan ayam tipe Hi-Pro-Vite A594, sekam padi, kertas label, tisu, lateks, masker, kapas, koagulan EDTA, larutan Turk, larutan Giemsa, dan kloroform.

Alat-alat yang digunakan adalah alat gelas, *magnetic stirer*, *freezer* dan *air cooler*, kulkas, spuit dan jarum (alat sonde), satu set kandang tikus (32 kandang), tissue, kapas, box/stoples, *dissecting set*, tabung *vacutainer*, hemositometer, gelas benda, *cover slip*, mikroskop, alat tulis, kamera, dan alat protokol kesehatan lengkap.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 32 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague Dawley* jantan dewasa dengan umur 2,5 bulan dan rerata bobot badan 200 gram, tanpa cacat anatomi, diperoleh dari Unit Penyediaan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Daun mimba diperoleh dari lingkungan Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia. Satu kilogram daun mimba dikeringkan dalam oven pada suhu $\pm 45-50^{\circ}\text{C}$ selama 3 hari. Ekstraksi etanol daun mimba dilakukan sesuai metode Fajriaty *et al.* (2018) dengan merendam bubuk daun mimba dalam etanol 70% selama 3×24 jam lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C . *Screening* fitokimia daun mimba secara kualitatif dilakukan di Laboratorium Universitas Semarang, Semarang, Jawa Tengah.

Pembuatan nanopartikel kitosan dilakukan sesuai metode Kamaraj *et al.* (2017) dengan cara mengencerkan 2 mg kitosan dengan asam asetat 1% lalu dihomogenisasi dengan stirer pada kecepatan 1200 rpm, suhu 60°C selama 5 menit kemudian dilakukan ultrasonifikasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Analisis ukuran nanopartikel dan indeks polidispersitas diukur menggunakan Malvern *Particle Size Analyzer* (UK) di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah. Pembuatan bahan uji nanopartikel dilakukan sesuai metode Sitasiwi dkk. (2021).

Prosedur penelitian dilakukan atas persetujuan dan pengawasan KEPK FK UNDIP No. 29/EC/H/FK-UNDIP/III/2021 (Sitasiwi dkk., 2021). Tikus dipelihara dalam kandang tikus ukuran 18 x 24 x 15 cm, pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Kondisi

lingkungan kandang diperiksa menggunakan *thermohygrometer* dengan pemantauan setiap pukul 09.00 (pagi) dan 16.00 (sore). Penggantian sekam (*bed cage*) dilakukan setiap 3 hari sekali. Tahap akhir aklimatisasi diawali penimbangan bobot badan dan pemeliharaan tikus *Sprague Dawley* dalam kondisi laboratorium selama satu minggu, sebelum dilakukan pemberian bahan uji.

Tikus dengan bobot badan seragam kemudian dikelompokkan menjadi 4 kelompok perlakuan. Kelompok P0 diberikan akuades dengan dosis 2 ml/ekor/hari. Kelompok P1 diberikan nanokitosan dengan dosis 2 ml/ekor/hari. Kelompok P2 diberikan NEEDM 50% dosis 2 ml/ekor/hari. Kelompok P3 diberikan NEEDM 100% dosis 2 ml/ekor/hari. Pemberian perlakuan secara oral selama 28 hari setiap sore, pada jam 15.00-16.00 WIB.

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-29, sehari setelah perlakuan berakhir. Hewan uji dibius menggunakan chloroform dalam wadah/kotak plastik, sampai tikus dalam keadaan tidak sadar. Hewan uji yang sudah tidak sadar diletakkan pada baki bedah dengan posisi terlentang, selanjutnya dilakukan pembedahan dari abdomen bagian bawah sampai ke rongga thoraks. Pengambilan darah langsung dilakukan dari bagian jantung. Jarum *syringe* digunakan untuk mengambil sampel darah secara intrakardial. Sampel darah tersebut ditampung dalam tabung *vacutainer* yang diberi bahan antikoagulan EDTA dengan perbandingan setiap 1 ml darah membutuhkan 1 mg EDTA. Darah yang tertampung dalam tabung EDTA segera dikocok pelan dengan gerakan angka delapan agar darah dan bahan antikoagulan tercampur. Sampel darah disimpan di dalam lemari pendingin bersuhu 4°C .

Jarum *syringe* digunakan untuk mengambil sampel darah secara intrakardial. Sampel darah tersebut ditampung dalam tabung *vacutainer* yang diberi bahan antikoagulan EDTA dengan perbandingan setiap 1 ml darah membutuhkan 1 mg EDTA lalu segera darah dikocok pelan dengan gerakan angka delapan supaya darah dan bahan antikoagulan tercampur. Sampel darah disimpan di dalam lemari pendingin bersuhu 4°C .

Penghitungan jumlah leukosit dilakukan melalui dua tahapan, yakni pengenceran dan

pengamatan secara mikroskopis di bawah mikroskop. Sediaan darah dihisap menggunakan pipet leukosit dan aspirator sampai batas garis 1 kemudian ditambahkan dengan larutan pengencer Turk hingga batas angka 11 selanjutnya dihomogenkan dengan gerakan angka delapan. Tahap perhitungan dilakukan dengan cara mengisi kamar hitung *Neubauer* dengan larutan darah pada pipet leukosit dan kemudian diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 10 x 40 kali. Leukosit dihitung berdasarkan jumlah sel yang berada pada 4 kotak besar pada bagian pojok. Diferensial leukosit dilakukan dengan pembuatan preparat apus darah. Preparat yang telah kering difiksasi dengan metanol dan selanjutnya direndam dalam larutan Giemsa selama 30 menit sebagai proses pewarnaan. Preparat ulas yang selesai diwarnai, diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 10 x 100 kali, dengan bantuan minyak emersi. Leukosit dihitung berdasarkan jenis yaitu limfosit, monosit, dan neutrofil segmen.

Hasil dan Pembahasan

Skrining fitokimia terhadap sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba telah dilakukan oleh Sitasiwi dkk. (2021). Skrining fitokimia digunakan untuk melihat gambaran senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu bahan alam atau tumbuhan tertentu. Hal ini sesuai dengan Agustina (2016) bahwa uji fitokimia digunakan untuk melihat komponen senyawa aktif pada sampel tanaman. Hasil pemeriksaan kandungan fitokimia ekstrak etanol daun mimba menunjukkan adanya senyawa fenolik, alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin, dan saponin serta tidak mengandung senyawa steroid (Sitasiwi dkk., 2021)

Tabel 1. Hasil *Screening* Fitokimia EEDM

Jenis senyawa	Hasil Screening
Fenolik	+
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Terpenoid	+
Tanin	+
Saponin	+
Steroid	-

Keterangan : + (mengandung senyawa bioaktif), tanda - (tidak mengandung senyawa bioaktif (data primer Sitasiwi dkk., 2021)

Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh ekstrak etanol daun mimba berpotensi sebagai antioksidan yang dapat mencegah dan menangkalkan radikal bebas. Winarsi (2004) menyatakan bahwa flavonoid sebagai antioksidan dapat berperan sebagai *free radical scavenger*, dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Hanani (2016) menyatakan bahwa tanin sebagai antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan menangkap elektron bebas dan berperan dalam inhibitor reaksi berantai pembentukan radikal bebas. Sharma et al. (2020) menyatakan peran saponin sebagai antioksidan dan *immunoenhancers* terletak pada gugus aldehida yang dimilikinya. Nurviana et al. (2020) menambahkan bahwa triterpenoid sebagai turunan dari senyawa terpen berfungsi sebagai donor hidrogen sehingga memiliki sifat antioksidan. Aktivitas antioksidan dapat berupa penghambatan pada tahap inisiasi reaksi berantai, pemblokiran pada tahap propagasi dengan merusak atau mengikat radikal bebas, dan penstabilan hidrogen peroksida (Supriyanto et al., 2017).

Berdasarkan hasil uji Particle Size Analyzer (PSA) menunjukkan bahwa nilai rata-rata ukuran partikel yaitu 202,3 nm untuk larutan nanokitosan (kelompok perlakuan P1), 324,9 nm untuk sediaan NEEDM 50% (kelompok perlakuan P2) dan NEEDM 100% (kelompok perlakuan P3) sebesar 297,3 nm (sesuai hasil penelitian Sitasiwi dkk., 2021). Kurniasari (2017) menyatakan bahwa komposisi partikel yang optimal dalam penggunaan PSA adalah partikel tersebut berukuran nano dalam rentang 389-877 nm. Hasil dari penelitian ini berhasil mendapatkan ukuran partikel nano karena masih di bawah rentang ukuran nanopartikel.

Informasi tambahan dari karakterisasi menggunakan PSA adalah nilai sebaran ukuran partikel atau *polydispersity index* (PDI). Nilai PDI menggambarkan tingkat keseragaman ukuran partikel pada suatu komponen. Luo et al. (2013) menyatakan bahwa semakin kecil nilai PDI maka distribusi partikel dalam suatu larutan akan semakin homogen. Ukuran dan nilai PDI pada nanopartikel adalah variabel fisikokimia utama, yang mengatur serapan seluler yang bergantung pada endositosis. Menurut Mozafari et al. (2018), nilai PDI lebih besar dari 0,7

menunjukkan bahwa sampel memiliki distribusi ukuran yang sangat luas. Nilai PDI tersebut menunjukkan bahwa rata-rata hasil nanopartikel yang disintesis bersifat homogen dan baik diaplikasikan sebagai *drug delivery*.

Tabel 2. Nilai PDI pada kelompok perlakuan dengan nanopartikel

Sampel Nanopartikel	Nilai PDI
P1	0.355
P2	0.427
P3	0.540

Keterangan: nilai sebaran ukuran partikel pada kelompok perlakuan P1 (larutan nanopartikel kitosan), P2 (sediaan NEEDM 50%), dan P3 (sediaan NEEDM 100%)

Hasil pengamatan jumlah leukosit, limfosit, monosit, dan neutrofil segmen pada tikus putih yang telah diberi perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil analisis statistik menunjukkan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba (NEEDM) tidak memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah leukosit total ($P < 0,05$). Delwatta *et al.* (2018) menyatakan bahwa jumlah normal leukosit pada tikus putih *Sprague Dawley* jantan berkisar 4,4-15,8 ribu/mm³ sehingga hasil penghitungan leukosit total pada penelitian ini masih dalam kisaran normal leukosit tikus.

Hasil dari analisis statistik Tabel 3 memperlihatkan bahwa nilai rata-rata limfosit pada kelompok perlakuan P0 (tikus normal diberi larutan akuades) berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P1 (tikus normal diberi larutan nanopartikel kitosan), P2 (tikus normal diberi sediaan NEEDM 50%), dan P3 (tikus normal diberi sediaan NEEDM 100%). Berdasarkan pengamatan tersebut, nilai rerata penghitungan limfosit antar kelompok perlakuan P1, P2 dan

P3 menunjukkan hasil berbeda tidak nyata yaitu sebesar 79,75/mm³; 77,00/mm³ dan 73,73/mm³. Berdasarkan hasil tersebut, nanokitosan dan ekstrak daun mimba dapat mempertahankan kadar limfosit dalam darah dan formulasi tersebut masih dapat ditoleransi oleh tubuh.

Nilai rerata limfosit antara kelompok P0 dan kelompok P1, P2, P3 menunjukkan hasil yang berbeda secara signifikan dimana nilai rerata kelompok P0 sebesar 61,00/mm³. Nilai rerata tersebut cenderung rendah dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Kenaikan jumlah limfosit tersebut masih dalam kisaran normal limfosit dalam darah. Delwatta *et al.* (2018) menyatakan bahwa kadar limfosit normal pada tikus *Sprague Dawley* jantan berada dalam kisaran 61-86 x 10³/mm³. Kenaikan jumlah limfosit dalam darah menandakan perlakuan dengan ekstrak daun mimba dapat meningkatkan jumlah limfosit. Hal tersebut sesuai dengan Lisdawati (2002) senyawa flavonoid dapat meningkatkan proliferasi limfosit. Hal tersebut mengindikasikan sediaan senyawa yang mengandung flavonoid dalam bentuk nanokitosan 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. Menurut Alam *et al.* (2011) sifat *immunoenhancers* digunakan untuk menstimulasi dan mempertahankan sistem imun.

Kombinasi nanopartikel dengan biopolimer kitosan memberikan potensi yang menjanjikan karena kitosan merupakan biopolimer alam yang dapat menjadi agen imunomodulator

Tabel 3. Rataan jumlah leukosit dan diferensial leukosit setelah perlakuan

Perlakuan	Variabel			
	Leukosit Total 10 ³ cell/μL	Limfosit 10 ³ cell/μL	Monosit 10 ³ cell/μL	Neutrofil segmen 10 ³ cell/μL
P0	7.53 ^a ±4.28	61.00 ^a ±13.23	8.66 ^a ±0.58	30.33 ^b ±3.80
P1	4.60 ^a ±2.78	79.75 ^b ±3.77	6.35 ^a ±0.50	13.50 ^a ±3.51
P2	5.92 ^a ±3.17	77.00 ^b ±5.42	8.50 ^a ±6.35	14.50 ^a ±5.80
P3	5.72 ^a ±2.89	73.73 ^b ±9.51	7.46 ^a ±3.20	19.75 ^{ab} ±4.99

Keterangan: nilai dengan superskrip berberbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda secara nyata ($P < 0,05$), P0 (tikus normal diberi akuades), P1 (tikus normal diberi nanokitosan), P2 (tikus normal diberi NEEDM 50%), dan P3 (tikus normal diberi NEEDM 100%)

disamping juga merupakan biopolimer yang stabil. He & Hwang (2016) menyatakan bahwa kitosan merupakan polimer alam yang memiliki 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. Martien *et al.* (2018) menjelaskan bahwa nanopartikel kitosan dapat membuka *tight junction* pada membran intestinal secara sementara dengan mekanisme translokasi protein dari membran ke sitoplasma.

Berdasarkan Tabel 3 nilai rataan monosit pada semua kelompok tidak berbeda secara signifikan. Nilai rataan monosit berturut-turut pada kelompok perlakuan P0, P1, P2, dan P3 yaitu 8,66/mm³; 6,35/mm³; 8,50/mm³; dan 7,46/mm³. Hal tersebut menandakan perlakuan dengan NEEDM menunjukkan nilai rataan monosit yang relatif sama sehingga perlakuan dengan NEEDM tidak bersifat toksik serta dapat bekerja dengan baik dalam mempertahankan kinerja sistem imun. Marlinda dkk. (2016) menyatakan bahwa monosit di dalam sistem imun berfungsi sebagai makrofag yang memfagositosis bakteri dan mikroorganisme lainnya, dengan cara membentuk komplemen dan mengeluarkan substansi yang mempengaruhi terjadinya proses peradangan kronik. Fungsi monosit akan terganggu jika membran monosit tidak berfungsi dengan baik karena substansi tertentu, misalnya radikal bebas. Senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, saponin, fenolik berperan sebagai antioksidan alami. Antioksidan tersebut berfungsi sebagai pencegah terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan suatu kondisi tubuh yang ditandai dengan ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dengan jumlah antioksidan. Tingginya jumlah radikal bebas akan merugikan tubuh karena mampu mengoksidasi molekul di sekitarnya (protein, karbohidrat, lipid, dan DNA) (Werdhasari, 2014).

Berdasarkan tabel 3 nilai rataan neutrofil segmen antar kelompok perlakuan terdapat perbedaan nyata ($P < 0,05$). Nilai rataan neutrofil

segmen masing-masing kelompok perlakuan P0, P1, P2, dan P3 secara berturut-turut sebesar 30,00/mm³, 13,50/mm³; 14,50/mm³ dan 19,75/mm³. Rentang normal neutrofil pada tikus galur Sprague Dwaley jantan menurut Delwatta *et al.* (2018) berkisar antara 13-36/mm³ sehingga hasil rataan neutrofil segmen dari semua kelompok perlakuan berada dalam kisaran normal. Hal tersebut mengindikasikan bahwa nanopartikel kitosan dan pemberian sediaan NEEDM mampu mempertahankan status neutrofil darah tikus serta dapat ditoleransi oleh tubuh (tidak bersifat toksik). Nilai rataan neutrofil pada kelompok P0 sebesar 30,00/mm³ terdapat perbedaan nyata, namun masih dalam batas normal. Atmadja *et al.* (2016) menyatakan bahwa peningkatan jumlah neutrofil dapat disebabkan adanya stres fisik atau emosional, trauma, dan kelainan metabolik. Hal tersebut mungkin karena kurangnya konsumsi antioksidan selama perlakuan. Werdhasari (2014) mengungkapkan antioksidan diperlukan untuk mencegah timbulnya stres oksidatif. Kondisi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas yang ada didalam tubuh dengan jumlah antioksidan akan menyebabkan stres oksidatif. Kelompok P0 merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan akuades (kontrol), akibat kurangnya asupan antioksidan sehingga rentan terjadi stres oksidatif. Maheswari (2017) menambahkan bahwa radikal bebas dalam tubuh akan meningkat karena aktivitas monosit selama *stressor* masih ada, untuk mengatasinya maka tubuh akan memicu peningkatan neutrofil.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perlakuan dengan sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol daun mimba memberikan efek terhadap kadar leukosit dalam darah.

Acknowledgement

Penulis menyampaikan terima kasih atas dukungan dana serta fasilitas penelitian yang diberikan kepada penulis. Penelitian ini terlaksana dengan Sumber Dana Selain APBN Fakultas Sains dan Matematika UNDIP Tahun Anggaran 2021 dengan Nomer Kontrak: 2173/UN7.5.8.2/PP/2021 dengan Ketua Peneliti: Dr. Agung Janika Sitasiwi, M.Si.

Daftar Pustaka

- Aguirre, T.A.S., Teijeiro-Osorio, D., Rosa, M., Coulter, I.S., Alonso, M.J. dan Brayden, D.J. (2016). Current status of selected oral peptide technologies in advanced preclinical development and in clinical trials. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 106:223–241.
- Agustina, A. (2016). Skrining Fitokimia Tanaman Obat di Kabupaten Bima. *Indonesian E-Journal of Applied Chemistry*. 4(1) : 1-10
- Ajazuddin, & S. Saraf. (2010). Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *J Fitoterapia*. 81 (7): 680-689.
- Alam, A., S. Haldar, H. Thulasiram, V. Kumar, R. Goyal, M. Iqbal, M. S., Bandyopadhyay. (2012). Novel Anti-Inflammatory Activity of Epoxyazadiradione Against Macrophage Migration Inhibitory Factor: Inhibition of Tautomerase and Proinflammatory Activities of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Journal of Biological Chemistry*. 287 (29): 24844–24861.
- Atmadja, A. S., Kusuma R., Dinata F. (2016). Pemeriksaan Laboratorium untuk Membedakan Infeksi Bakteri dan Infeksi Virus. *CDK*. 43(26) : 457-461.
- Braga, L. R., L. M. Perez, M. V. Soazo, & F. Machado. (2019). Evaluation Of The Antimicrobial, Antioxidant, And Physicochemical Properties Of Poly(Vinyl Chloride) Films Containing Quercetin And Silver Nanoparticles. *LWT-Food Sciences and Technology ELSEVIER*. 101: 491-498.
- Delwatta, S., M. Gunatilake, V. Baumans, M. D. Seneviratne, M. L. B. Dissanayaka, S. S. Batagoda, A. H. Udagedara, & P. B. Walpola. (2018). *Reference Values For Selected Hematological, Biochemical And Physiological Parameters Of Sprague-Dawley Rats At The Animal House*. Faculty Of Medicine, University Of Colombo, Sri Lanka. *Animal Model Exp Med*. 1: 250–254.
- Fajriaty, I., I. H. Hariyanto, A. Andres, & S. Risky. (2018). Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Dari Ekstrak Etanol Daun Bintangur (*Calophyllum soulattri* Burm. F.). *Jurnal Pendidikan Informatika dan Sains*. 7(1): 54-67.
- Hanani, E. 2016. Analisis Fitokimia. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- He, X. & H. M. Hwang. (2016). Nanotechnology in Food Science: Functionality, Applicability and Safety Assessment. *J Food Drug Anal*. 24(4): 671–681.
- Kafshgari, M. H , Mohammad K., Mobina K., Sahar K. (2011). Reinforcement of chitosan nanoparticles obtained by an ionic crosslinking process. *Iran Polym J*. 20 (5): 445-456.
- Kamaraj, C., P. R. Gandhi, G. Elango, S. Karthi. I. M. Chung, & G. Rajakumar. (2017). Novel and Environmental Friendly Approach; Impact of Neem (*Azadirachta indica*) Gum Nano Formulation (NGNF) on *Helicoverpa armigera* (Hub.) and *Spodoptera litura* (Fab.). *International Journal of Biological Macromolecules (Elsevier)*. 1(1):0141-8130.
- Khandia, R., A. Munjal, R. S. Bangrey, R. Mehra, K. Dhama, N. C. Sharma. (2015). Evaluation of Silver Nanoparticle Mediated Reduction Neovascularisation (Angiogenesis) in Chicken Model. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2(7) : 372-376.
- Kurniasari, D., & S. Atun. (2017). Pembuatan dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) pada Berbagai Variasi Komposisi Kitosan. *Jurnal Sains Dasar*. 6(1):31-35.
- Lisdawati, V. (2002). Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (scheff) Boerl.) Toksisitas, Efek Antioksidan, dan Efek Antikanker Berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi. Diakses pada 20 Mei 2022. <http://www.mahkotadewa.com/VPC/vivi.htm>.

- Luo, Y., T.T.Y. Wang, Z. Teng, P. Chen, J. Sun, & Q. Wang. (2013). Encapsulation Of Indole-3-Carbonil And 3,3-Diindolymethane Inzein/Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles With Controlled Release Property And Improved Stability. *Journal Food Chemistry*. 139: 224–230.
- Maheswari H., A. N. Sasmita, A. Farajallah, P. Achmadi, K. Santoso. (2017). Pengaruh Suhu terhadap Diferensial Leukosit Serta Kadar Malondialdehyde (MDA) Burung Puyuh (*Coturnix coturnix japonica*). *Jurnal Bioma*. 13(1): 81-89.
- Marlinda, Henny, E. L. Widiastuti, G.N. Susanto, Sutyarso. (2016). Pengaruh Pemberian Senyawa Taurin dan Ekstrak Daun Dewa Gynura segetum (Lour) Merr terhadap Eritrosit dan Leukosit Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo[α]Piren. *Jurnal Natur Indonesia*. 17(1): 13–21.
- Martien, R., A. Iramie, D. K. Irianto, F. Verda, & D. P. Sari. (2012). Perkembangan Teknologi Nanopartikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmaseutik*. 8(1):133-146.
- Mozafari, M. R. M. Danaei., M. Dehghankhold. S. Ataei, F. H. Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani. (2018). Impact of Particle Size And Polydispersity Index on The Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceuticals*. 5:1-23.
- Nurviana, V., A. Alifiar, W. T. Wulandari, R. Dewi, R. Nuraeni. (2020). Potensi Antioksidan Sediaan Nanopartikel Ekstrak Kernel Biji Limus (*Mangifera foetida* Lour). *Jurnal Farmasi Udayana*. 2020: 144-151.
- Paul, R., M. Prasad, & N. K. Sah. (2011). Anticancer Biology of *Azadirachta indica* L (neem): A Mini Review. *Cancer Biology and Therapy*. 12(6): 467–476.
- Prasetiowati, A. L., Prasetya A. T., Wardani S. (2018). Synthesis of silver nanoparticles with bioreductors of starfruit leaf extract (*Averrhoa bilimbi* L.) testing its activity as antibacterial. *Indones J Chem Sci*. 7 (2): 160.
- Sarkar, S., Singh RP, 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.
- Sharma, R., A. Palanisamy, K. Dharma, G. Mal. (2020). Exploring The Possible Use of Saponin Adjuvants in COVID-19 Vaccine. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 16(12): 2944-2953.
- Sitasiwi, Agung J., S. Isdadiyanto, S.M. Mardiaty. (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.
- Supriyanto, S., B. Sinon, M. Rivai, & Yuniarta. (2017). Uji fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). *Prosiding SNATIF*. 2017: 523-529.
- Werdhasari, A. (2014). Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. 3(2) : 59-68.
- Winarsi, H. (2007). Antioksidan Alami & Radikal Bebas : Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan. Kanisius, Yogyakarta.
- Winarti, L., Suwaldi, Martien, R. & Hakim, L. (2018). Formulation of insulin self nanoemulsifying drug delivery system and its in vitro-in vivo study. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 29(3):157–166.