

**Potensi Sediaan Nanokitosan Ekstrak Daun Mimba
(*Azadiractha indica* A. Juss) terhadap Fertilitas
Tikus Putih Betina (*Rattus norvegicus*)**

(POTENTIAL OF NANOCHITOSAN PREPARATIONS OF NEEM LEAF
(AZADIRACTHA INDICA A. JUSS) EXTRACT ON FERTILITY
OF FEMALE WHITE RAT (*RATTUS NORVEGICUS*))

**Erlalana Hansel Christian Sitepu¹, Putri Lestari Ningtias²,
Alfisah Gama Putra³, Adelia Brilian Damayanti⁴,
Aurel Elizabeth Darsono⁵, Agung Janika Sitasiwi^{6*}, Teguh Suprihatin⁷**

Departemen Biology,
Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro,
Jl. Prof. Sudarto No. 13, Tembalang, Kec. Tembalang,
Kota Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275
081575299747; Email: agssiwi@yahoo.co.id

ABSTRACT

The potential of neem leaves as an antifertility compound in female rats needs to be studied more thoroughly because they contain various toxic secondary metabolites. This study was aimed to examine the effect of exposure to nanochitosan ethanol extract of neem leaves as an antifertility compound on female white rats. Extraction and manufacture of nanochitosan using 70% ethanol solvent. A total of 24 adult female wistar rats aged 2-3 months were used as experimental animals. This study used a completely randomized design (CRD) with three treatments and eight replications. The treatments given were P0 (aquadest), P1 (ethanol extract of neem leaves at a dose of 14 mg/kgBW/day), P2 (a nanochitosan preparation of ethanol extract of neem leaves at a dose of 14 mg/kgBW/day). The treatment was given orally for 21 days. Observation of fertility was carried out by observing the corpus luteum and measuring the rate of pregnancy through mating tests. Data was analyzed by using Analysis of Variance. The results showed that the highest *Gonadosomatic Index* (GSI) score was found in the P1 group because it was influenced by gonad weight and individual response variations. Exposure of nanochitosan preparations of neem leaf extract to the number of corpus luteum showed a difference with the lowest result found in the P2 group. The lowest success rate of embryo implantation was found in treatments P1 and P2 with embryos not developing or resorption. It can be concluded that exposure to nanochitosan preparations of ethanol extract of neem leaves has a very effective antifertility effect on female white rats.

Keywords: neem; nanochitosan; antifertility

ABSTRAK

Potensi daun mimba sebagai senyawa antifertilitas pada tikus betina perlu dikaji dengan lebih teliti karena mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba sebagai senyawa antifertilitas terhadap tikus putih betina. Ekstraksi dan pembuatan nanokitosan menggunakan pelarut etanol 70%. Tikus wistar betina dewasa dengan kisaran usia 2-3 bulan sejumlah 24 ekor digunakan sebagai hewan uji. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan delapan ulangan. Perlakuan diberikan yaitu P0 (akuades), P1 (ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB/hari), P2 (sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB/hari). Perlakuan diberikan secara oral selama 21 hari. Pengamatan fertilitas dilakukan dengan penentuan nilai GSI, pengamatan korpus luteum dan tingkat keberhasilan implantasi embrio (kebuntingan) melalui uji kawin. Data dianalisa dengan uji sidik ragam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai *Gonadosomatic Index* (GSI) tertinggi ditemukan pada kelompok P1 karena dipengaruhi oleh bobot gonad dan variasi respons individu. Paparan sediaan nanokitosan ekstrak daun mimba terhadap jumlah korpus luteum menunjukkan perbedaan dengan hasil terendah ditemukan pada kelompok P2. Tingkat keberhasilan implantasi embrio terendah ditemukan pada perlakuan P1 dan P2 dengan kondisi embrio tidak berkembang atau resorpsi. Dapat disimpulkan bahwa paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba memiliki pengaruh antifertilitas yang sangat efektif terhadap tikus putih betina.

Kata-kata kunci: daun mimba; nanokitosan; antifertilitas

PENDAHULUAN

Paparan ekstrak etanol daun mimba sebagai senyawa antifertilitas menunjukkan bahwa pada dosis 400 mg/kg BB/ekor/hari tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada nilai Indeks Gonadosomatik dan ukuran folikel de Graff pada mencit betina (Hidayah *et al.*, 2018). Laporan penelitian Sitasiwi *et al.* (2019) menunjukkan bahwa paparan ekstrak etanol daun mimba pada dosis yang sama mampu menekan ekspresi protein pada testis dan sintesis hormon estradiol.

Daun mimba mengandung senyawa aktif berupa saponin, flavonoid dan alkaloid. Saponin memiliki efek negatif pada reproduksi ternak, seperti aborsi atau kematian, menyebabkan kemandulan dan penghentian proses kebuntingan (Ujah *et al.*, 2021). Saponin dapat menurunkan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan menghambat sekresi *Luteinizing Hormone* (LH) (Nita *et al.*, 2016). Saponin bekerja pada

aksis hipotalamus-hipofisis-ovarium memengaruhi sekresi gonadotropin, dengan mekanisme umpan balik negatif dari hipotalamus menyebabkan penurunan produksi *Gonadotrophin Releasing Hormon* (GnRH). Hal ini dapat menurunkan sekresi hormon perangsang folikel (FSH) dan *Hormon Luteinizing* (LH) dari hipofisis anterior. Kedua hormon tersebut sangat berpengaruh dalam pembentukan, perkembangan dan pematangan gamet (Gomez *et al.*, 2001). Flavonoid bekerja dengan sifat estrogenik yang cara kerjanya menyerupai estrogen karena dapat berikatan dengan reseptor estrogen (Satyaningtija *et al.*, 2014). Resende *et al.* (2013) flavonoid merupakan senyawa fitoestrogen yang dapat menyebabkan estrogen alami tidak dapat berikatan dengan reseptornya dan akan meningkatkan jumlah estrogen bebas dalam darah. Soraya dan Wulandari (2019) menyatakan bahwa daun mimba mengandung steroid. Alkaloid steroid bertindak sangat

mirip dengan saponin yang digunakan sebagai dasar untuk sintesis hormon steroid.

Hasil pengujian ekstrak tumbuhan mimba dengan dosis yang sama terhadap hewan coba menunjukkan hasil yang bervariasi, kemungkinan disebabkan oleh perubahan struktur senyawa aktif akibat degradasi oleh reaksi enzimatis pada proses pencernaan (Safitri, 2014). Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan melakukan pengemasan dalam bentuk nanopartikel yang dapat meningkatkan bioavailabilitas obat dan menurunkan efek obat pada jaringan non target (Estuningtyas, 2018). Hasil penelitian yang dilakukan *in vivo* oleh Khandia *et al.* (2015) menyatakan bahwa penggunaan nanopartikel silver daun mimba dapat mereduksi viabilitas pembuluh darah dari membran *chorioallantoic* dalam perkembangan embrio telur ayam yang menyebabkan kematian pada embrio.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian untuk menguji pengaruh sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba (SNEEDM) terhadap fertilitas tikus betina yang ditunjukkan dengan nilai GSI (*Gonadosomatic index*), jumlah korpus luteum, frekuensi kebuntingan, dan jumlah embrio dalam uterus.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah diperiksa dan disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dengan No. 50/EC/H/FK-UNDIP/V/2022. Penelitian ini dilakukan selama lima minggu. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar dan Kandang Hewan Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan delapan ulangan.

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah beberapa kandang

pemeliharaan tikus, wadah minum, wadah pakan, timbangan analitik, timbangan digital, *magnetic stirrer*, jarum *gavage*, spuit 3 mL, gelas ukur, sarung tangan, seperangkat alat bedah dan seperangkat alat untuk pembuatan nanopartikel.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah hewan uji berupa 24 ekor tikus betina galur Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Laboratorium, ekstrak etanol daun mimba 70%, seperangkat bahan pembuatan sediaan nanokitosan, akuades, sekam padi, air minum, pakan, larutan garam fisiologis (NaCl), larutan PBS, seperangkat bahan untuk menentukan kesuburan hewan betina.

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 air minum ditempatkan di dalam kandang kemudian kandang ditutup rapat.

Pembuatan Simplisia Daun Mimba

Daun mimba (*A. indica*) dipetik pada ruas 4 sampai 20 dan dicuci sampai bersih. Daun bersih diangin-anginkan selama 12 jam dan dimasukan ke dalam oven selama tiga hari pada suhu 45°C. Daun mimba yang sudah kering digiling dan disimpan dalam wadah tertutup (Sitasiwi *et al.*, 2016).

Ekstraksi Etanol Daun Mimba

Simplisia daun mimba diekstraksi dengan pelarut etanol 70%. Proses ekstraksi daun mimba dilakukan menurut metode Abror *et al.* (2018) yaitu daun mimba yang telah dikeringkan, dihaluskan dengan penggiling mekanis *blender* dan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran *mesh* 40. Ekstraksi serbuk mimba menggunakan etanol 70% (pada suhu 50°C) menggunakan *Soxhlet*. Ekstraksi dilakukan sampai ekstrak menjadi tidak berwarna. Ekstrak ke-

mudian dipekatkan dengan proses distilasi, sehingga diperoleh massa semi padat dengan pelarut bebas. Ekstrak siap digunakan sebagai bahan uji percobaan (Sitasiwi *et al.*, 2016).

Uji Persiapan Hewan

Hewan uji diaklimatisasi selama tujuh hari. Selama aklimatisasi, tikus diberi makan dan air minum secara *ad libitum*, diperlihara dengan suhu lingkungan kandang 26°C dan kelembapan 75%. Tikus dengan bobot badan seragam kemudian dikelompokkan menjadi tiga kelompok perlakuan dengan delapan ekor tikus sebagai ulangan. Penimbangan tikus Wistar dilakukan pada akhir aklimasi.

Pemberian Perlakuan

Pembuatan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dilakukan dengan cara melarutkan 1,4 g kitosan dalam 1L asam asetat 1%. Larutan tersebut selanjutnya ditambah 700 mg ekstrak daun mimba dan dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya ditambahkan 25 mL larutan Natrium Trifosfat ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) 0,1% dan dievaporasi hingga membentuk suspensi nanopartikel (Handayani *et al.*, 2022).

Pemberian Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Mimba (SNEEDM). Pemberian diberikan melalui *oral probe* masing-masing dengan volume 2 mL/ekor/hari. Bahan uji diberikan selama 21 hari. Setelah pemberian bahan uji selesai, pada hari ke-21 tikus betina dikawinkan dengan menggabungkan tikus jantan ke dalam kandang tikus betina dengan perbandingan (2 betina :1 jantan). Penggabungan tikus jantan dan tikus betina dilakukan selama lima hari.

Isolasi Sampel Uterus dan Ovarium

Isolasi sampel uterus dilakukan setelah 21 hari perlakuan. Hewan uji dibius menggunakan kloroform. Proses pembiusan dilakukan dengan memasukkan hewan uji ke dalam wadah plastik yang telah diberi kapas

dengan 5-10 tetes kloroform, kemudian wadah ditutup rapat. Hewan dibiarkan di dalam wadah hingga hewan terbius dan tidak sadarkan diri, selanjutnya tikus diletakan di atas nampan bedah. Pembedahan hewan uji dilakukan dari abdomen bagian bawah, kemudian sampel uterus diisolasi.

Isolasi ovarium dilakukan bersamaan dengan isolasi uterus. Ovarium yang sudah diisolasi ditimbang untuk menentukan nilai *Gonadosomatic Index* (GSI). Ovarium yang telah ditimbang selanjutnya difiksasi untuk pengamatan dan penghitungan korpus luteum.

Perhitungan Nilai GSI (*Gonadosomatic Index*)

Nilai GSI (%) dihitung dengan menggunakan rumus sesuai pada penelitian Naghdi *et al.* (2016) sebagai berikut, $\text{GSI} = (\text{BG} \times \text{BB}^{-1}) \times 100\%$. Keterangan: GSI = Gonadosomatik indeks (%); BG = Bobot gonad (g); BB = Bobot Tubuh (g)

Perhitungan Jumlah Korpus Luteum

Ovarium dibuat sediaan histologis dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksilin Eosin dengan ketebalan sayatan 5 μm . Pengamatan ovarium dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 40x. Struktur korpus luteum merupakan struktur dalam ovarium yang sebagian besar tersusun atas jaringan ikat (Ozturk *et al.*, 2015). Perhitungan jumlah korpus luteum dilakukan pada setiap sediaan histologis ovarium.

Perhitungan Peresentase Kebuntingan

Peresentase kebuntingan hewan uji dilakukan setelah uji kawin. Persentase kebuntingan dilakukan dengan menghitung jumlah hewan betina yang menunjukkan *vaginal plug* dan menunjukkan perubahan morfologi abdomen hingga hari ke-10 setelah terbentuknya *vaginal plug* (Rahandity *et al.*, 2021).

Perhitungan Jumlah Embrio

Jumlah embrio dihitung dengan mengisolasi uterus kemudian dilakukan perhitungan embrio dalam uterus hewan percobaan (Ragandity *et al.*, 2021).

Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah nilai GSI (*Gonadosomatic Index*), jumlah korpus luteum, frekuensi kebuntingan, dan jumlah embrio dalam uterus pada hewan uji setelah 21 hari perlakuan dan uji kawin.

Analisis Data

Data numerik dianalisis dengan uji sidik ragam satu arah (*Oneway Analysis of Variance*) pada tingkat kepercayaan 95%. Hasil analisis data bobot badan, bobot gonad dan GSI menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan, sehingga tidak dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil uji sidk ragam paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba terhadap GSI menunjukkan perbedaan tidak nyata ($P > 0,05$). Nilai GSI dipengaruhi oleh bobot gonad. Kelompok perlakuan P1 memiliki rerata bobot gonad tertinggi dibanding kelompok P0 dan P2. Hal tersebut menyebabkan nilai GSI tertinggi pada perlakuan P1. Saputra *et al.* (2021) menyatakan bahwa faktor yang memengaruhi nilai GSI adalah bobot badan dan bobot gonad. Hewan uji dalam penelitian ini menunjukkan bobot badan dalam kisaran bobot badan yang normal. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Setiawan *et al.* (2022) yang menyatakan bahwa bobot badan tikus Wistar betina berkisar 160 -180 g pada usia 6-10 minggu. Rerata bobot ovarium hewan uji pada tikus Wistar 0,05–0,07 g (Nurjanah dan Widyaningrum, 2016) sehingga dapat dikatakan bahwa bobot ovarium dalam penelitian ini juga dalam kisaran normal

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Nilai *Gonadosomatic Index* (GSI)

Parameter	P0	P1	P2
	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Bobot Badan	176,25 ^a ± 43,073	157,5 ^a ± 23,754	168,75 ^a ± 27,998
Bobot Gonad	0,056 ^x ± 0,01	0,074 ^x ± 0,016	0,06 ^x ± 0,01
GSI	0,032 ^p ± 0,007	0,047 ^p ± 0,012	0,035 ^p ± 0,01

Keterangan: Data disajikan berupa rata-rata (X) ± simpangan baku (SD). Rerata dengan superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata ($P > 0,05$). P0 (akuades), P1 (ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB), P2 (sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB). GSI (*Gonadosomatic index*)

Bobot badan serta bobot ovarium hewan uji setelah pemberian bahan yang menunjukkan perbedaan tidak nyata menyebabkan nilai GSI juga tidak berbeda nyata. Nilai GSI pada penelitian ini berdasar hasil penelitian Setiawan *et al.* (2022) masih dalam kisaran nilai normal untuk tikus, yaitu sekitar 0,02-0,04.

Nilai GSI ditentukan oleh perbandingan bobot gonad dan bobot badan. Bobot gonad ditentukan oleh siklus estrus dan perkembangan folikel yang terdapat dalam ovarium (Setiawan *et al.*, 2022). Effendi *et al.* (2016) dan Mardika *et al.* (2018) menyatakan bahwa peningkatan bobot gonad terjadi akibat

adanya peningkatan cairan transudat hasil sekresi sel-sel granulosa pada saat perkembangan folikel dalam ovarium.

Penelitian ini mengamati jumlah korpus luteum. Korpus luteum merupakan struktur dalam ovarium yang terbentuk

setelah terjadinya ovulasi (Otzurk *et al.*, 2015). Struktur histologi korpus luteum disajikan pada Gambar 1. Rata-rata jumlah korpus luteum dan jumlah embrio disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rerata Jumlah dan Diameter Korpus Luteum tikus setelah pemberian ekstrak etanol daun mimba dan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba

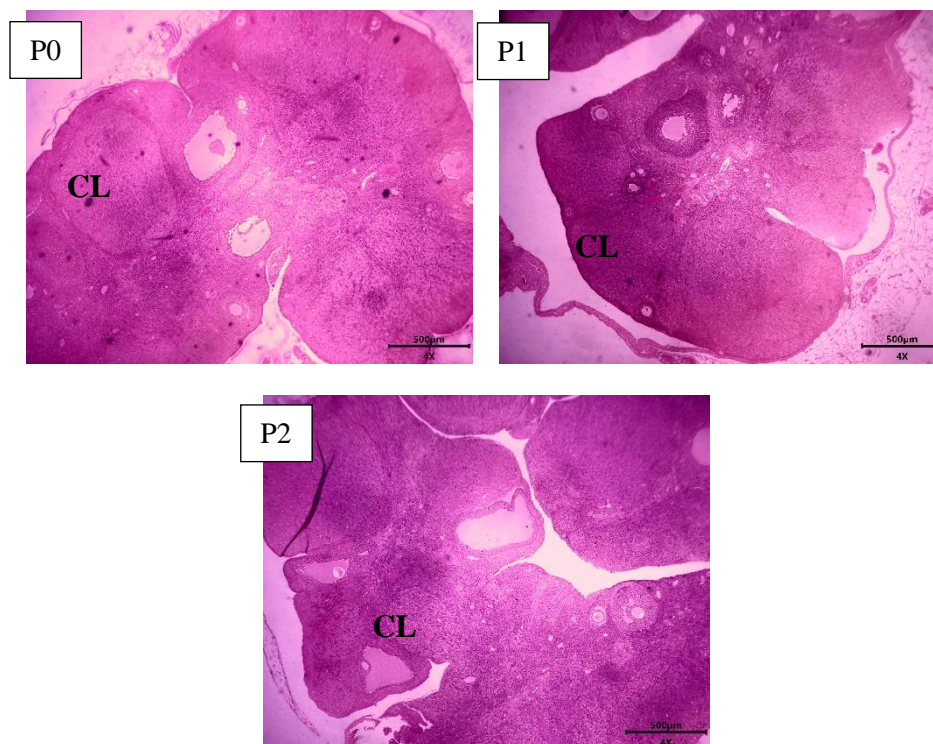
Parameter	P0	P1	P2
	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Jumlah Korpus Luteum	13,33 ^a ± 3,21	10,33 ^a ± 2,51	10,00 ^a ± 1,73
Jumlah Embrio	11,72 ^p ± 3,54	9,63 ^p ± 4,21	8,96 ^p ± 2,21

Keterangan: Data disajikan berupa rata-rata (X) ± simpangan baku (SD). Rerata dengan superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata ($P > 0,05$). P0 (akuades), P1 (ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB), P2 (sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB).

Hasil pengamatan menunjukkan rata-rata jumlah korpus luteum pada setiap kelompok perlakuan tidak berbeda nyata. Hasil analisis statistika membuktikan bahwa ukuran diameter korpus luteum berbeda nyata antar kelompok perlakuan. Na'ima *et al.* (2012) menyatakan bahwa korpus luteum merupakan tahap lanjut dari folikel de Graaf setelah ovulasi. Jumlah korpus luteum dalam penelitian ini berkisar 10-13 korpus luteum dalam setiap hewan uji. Setiawan *et al.* (2022) menyatakan bahwa jumlah tersebut masih dalam kisaran jumlah korpus luteum yang normal. Penelitian Chin-Chao *et al.* (2021) menyatakan bahwa pemberian ekstrak mimba secara oral dapat mengurangi

jumlah folikel pada tikus. Paparan ekstrak mimba dapat memberikan efek penghambatan folikulogenesis dan pembentukan antrum dalam folikel pada tikus betina. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol daun mimba baik dalam bentuk sediaan nanokitosan (P2) maupun sediaan ekstrak etanol daun mimba (P1) menunjukkan potensi yang sama dalam menyebabkan ovulasi.

Struktur histologis korpus luteum pada ovarium hewan uji setelah pemberian ekstrak etanol daun mimba dan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Korpus luteum dalam ovarium P0, P1, dan P2 dengan perbesaran 40X. CL = korpus luteum. P0 (akuades), P1 (ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB), P2 (sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 14 mg/kgBB).

Daun mimba memiliki bermacam-macam kandungan metabolit sekunder, di antaranya flavonoid, steroid, saponin, dan alkaloid, yang dapat mengganggu struktur dan fungsi jaringan reproduksi (Aulia *et al.*, 2023). Penelitian Haryono *et al.* (2013) menyatakan bahwa kandungan steroid dan terpenoid pada senyawa antifertilitas dapat memperpanjang siklus estrus. Siklus estrus merupakan perubahan ekspresi estrogen dalam tubuh hewan yang terjadi karena perkembangan folikel dalam ovarium (Ajayi dan Akhiqbe, 2020). Proses perkembangan folikel dalam ovarium dipengaruhi konsentrasi hormon FSH dan LH. Chaube *et al.* (2014) menyatakan bahwa paparan sediaan ekstrak etanol daun mimba diduga menghambat folikulogenesis melalui efek hormonal. Kandungan steroid dan terpenoid dalam daun mimba dapat menurunkan

produksi hormon estradiol yang berpengaruh dalam meningkatkan konsentrasi LH dan menekan konsentrasi FSH yang berperan dalam perkembangan folikel ovarium.

Paparan obat herbal menurut Mardika *et al.* (2018) merupakan faktor yang memengaruhi bobot ovarium hewan uji. Effendi *et al.* (2016) menyatakan bahwa flavonoid dan steroid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun mimba merupakan fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa yang dapat memengaruhi perkembangan folikel dalam ovarium. Perbedaan tidak nyata dalam penelitian ini diduga karena senyawa fitoestrogen yang terkandung dalam bahan uji relatif rendah, sehingga meskipun senyawa fitoestrogen mampu berikatan dengan reseptor estrogen tetapi kemungkinan tidak menyebabkan gangguan signifikan dalam perkembangan

folikel dalam ovarium. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Mardika *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa fitoestrogen yang mampu berikatan dengan reseptor estrogen akan menyebabkan perubahan hormon reproduksi sehingga memengaruhi perkembangan folikel dalam ovarium. Perkembangan folikel dalam ovarium merupakan salah satu faktor yang menentukan bobot ovarium.

Penelitian Sitasiwi *et al.* (2023) membuktikan bahwa ukuran partikel nanokitosan yang dibuat dengan metode tersebut berkisar 300 nm. Ukuran tersebut memungkinkan senyawa aktif dalam ekstrak etanol daun mimba dapat mencapai sel target, sehingga dapat memengaruhi beberapa proses dalam sel. Pengemasan bahan uji dalam ukuran nano diduga menyebabkan keseluruhan senyawa yang terkandung dalam daun mimba dapat terlindungi dan masuk ke dalam organ reproduksi secara optimal. Hal tersebut memberikan efek penurunan jumlah individu baru (embrio).

Senyawa antifertilitas pada sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba bekerja dengan cara menghambat implantasi dan perkembangan embrio. Kandungan alkaloid pada daun mimba yang masuk ke dalam membran sel telur dan embrio dapat memengaruhi integritas membran dan perkembangan embrio yang berakibat pada kematian embrio (Nugrahaeni *et al.*, 2022). Senyawa antifertilitas lainnya yang terkandung pada daun mimba seperti saponin dan flavonoid bekerja secara estrogenic karena memiliki struktur seperti hormon estrogen. Senyawa tersebut dapat merangsang kontraksi uterus dan berakibat terganggunya fertilisasi dan perkembangan embrio. Hal tersebut sejalan dengan pendapat Harlis *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa zat yang bersifat estrogenik dapat mengganggu kebuntingan apabila diberikan pada masa pra-implantasi dan pasca-implantasi. Kandungan zat estrogenik dalam daun mimba tersebut yang

diduga menyebabkan kegagalan implantasi dan kematian embrio dalam uterus.

Gangguan sintesis hormon estrogen akibat paparan sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba diduga dapat menyebabkan terhambatnya perkembangan struktur dan/ atau fungsi dinding uterus yang dapat memengaruhi implantasi. Penelitian Alfiyanti *et al.* (2019) menunjukkan bahwa paparan ekstrak etanol daun mimba memberikan perbedaan bermakna terhadap tebal endometrium mencit. Ekstrak etanol daun mimba dapat menyebabkan penurunan ketebalan endometrium mencit. Endometrium merupakan lapisan yang paling sensitif terhadap perubahan hormon reproduksi. Senyawa antifertilitas dalam sediaan nanokitosan ekstrak etanol daun mimba dapat menimbulkan gangguan keseimbangan hormon reproduksi yang berpengaruh pada terhambatnya proliferasi sel penyusun endometrium. Ketebalan endometrium yang rendah dapat memengaruhi implantasi embrio. Semakin tipis endometrium maka semakin kecil terjadinya kebuntingan. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa paparan ekstrak etanol daun mimba dalam bentuk sediaan nanokitosan menyebabkan semua variabel berbeda tidak signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol yang hanya diberi akuades atau dengan kelompok yang diberi ekstrak etanol daun mimba saja.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian sediaan nanokitosan ekstrak daun mimba tidak mengubah potensi senyawa aktif dalam ekstrak daun mimba.

SARAN

Penelitian ini hanya mengamati jumlah korpus luteum dalam ovarium. Peneliti menyarankan sediaan histologis ovarium secara seri, sehingga dapat

dievaluasi efek bahan uji terhadap perkembangan seluruh jenis folikel dalam ovarium tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti menyampaikan terima kasih 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 YK, Woelansari ED, 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.
- Ajayi AF, Akhigbe RE. 2020. Staging of the Estrous Cycle and Induction of Estrus in Experimental Rodents: An Update. *Fertility Research and Practice* 6: 1-15.
- Alfiyanti A, Sitaswi AJ, Mardiaty SM. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) terhadap Berat Uterus dan Tebal Endometrium Mencit (*Mus musculus* L.). *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 4(1): 82-89.
- Chin-Chao H, Hsu L, Shuo- Yuan H, Ying-Chih L, Chang HH, Tien-Chao H. 2021. Ovarian Folliculogenesis and Uterine Endometrial Receptivity After Intermittent Vaginal Injection Of Recombinant Human Folliclestimulating Horone In Infertile Women Receiving In Vitro Fertilization And In Immature. *International Journal of Molecular Sciences* 22(19): 1-19.
- Effendi EM, Maheswari H, Juliati E. 2016. Optimisasi Sediaan Konsentrat Ekstrak Etanol 70% dan 96% Herba Kemangi sebagai Fitoestrogen pada Tikus Putih Betina (*Rattus norvegicus*). *Fitofarmaka* 6(1): 9-21.
- Estuningtyas A, Widiyanti S, Kusmardi K. 2018. Acute Toxicity of Chitosan Nanoparticles Containing Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Leaf Extract and Anti-Inflammatory Effects in Dextran Sodium Sulfate-Induced Mouse Model of Ulcerative Colitis. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 10(5) 6-10.
- Harlis WO, Malik N, Amalia H. 2017. Kebuntingan Mencit (*Mus musculus* L.) Tahap Pasca Implantasi Lanjut Pasca Pemberian Ekstrak Rimpang Jahe Putih (*Zingiber officinale* Var. Amarum). *Biowallacea* 4(2): 567-584.
- Haryono A, Gunawan YE, Suatma, Sumitro S, Rahmadur M. 2013. Antifertility Effect of Various Plants at Dayak Tribe to Swiss Webster Mice. *The Journal of Tropical Life Science* 3(2): 108-112.
- Khandia R, Munjal A, Bangrey RS, Mehra R, Dhama K, Sharma NC. 2015. Evaluation of Silver Nanoparticle Mediated Reduction Neovascularisation (Angiogenesis) in Chicken Model. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 2(7): 372-376.
- Mardika K, Setyawati I, Darmadi AAK. 2018. Panjang Siklus Estrus dan Struktur Histologi Ovarium Tikus Putih Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kaliandra Merah. *Jurnal Veteriner* 19(3): 342-350.
- Na'ima M, Susanti R, Christijanti W. 2012. The Effectiveness of Giving Palm Oil and Lemuru Oil in Accelerating

- Puberty in Female Rats. *Biosciences* 4(1): 36-41.
- Naghdi M, Maghbool M, Seifalah-Zade M, Mahaldashtian M, Makoolati Z, Kouhpayeh SA, Ghasemi A, Fereydou ni N. 2016. Effects Of Common Fig (*Ficus carica*) Leaf Extracts On Sperm Parameters and Testis Of Mice Intoxicated With Formaldehyde. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016: 2539127. doi: 10.1155/2016/2539127
- Nita S, Habisukan UH, Zen NF. 2016. "Saponin Biji Klabet pada Organ Reproduksi Tikus Jantan Sprague Dawley." *Jurnal Penelitian Sains* 18(2): 64.
- Nugrahaeni IK, Widyawati MN, Putri NR, Ramadhian AAN, Besmaya BM, Dewi DL. 2022. The Thickness of Endometrium after Given Fennel Seed Extract (*Foeniculum Vulgare* M.) and Mimba Leaves (*Azadirachia Indica* Juss): Experimental Study on Female Mice. *Jurnal Kebidanan* 12(1): 64-68.
- Nurjanah N, Widiyaningrum P. 2016. Perkembangan Ovarium Tikus Yang dipapar Radiasi Sinar X. *Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciences* 39(2): 85-91.
- Resende FA, Oliveira APS, Camargo MS, Vilegas W, Varanda EA. 2013. Evaluation of Estrogenic Potential of Flavonoids Using A Recombinant Yeast Strain And Mcf7/Bus Cell Proliferation Assay. *Plos One* 8(10): 1-7.
- Saffet O, Sozen B, Demir N. 2015. Epab and Pabpc1 are Differentially Expressed in The Postnatal Mouse Ovaries. *J Assist Reprod Genet* 32: 137-146.
- Saputra AR, Sitasiwi AJ, Saraswati TR. 2020. Gonadosomatic Index Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*) setelah Paparan Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica*) sebagai Senyawa Antifertilitas. *Jurnal Pro-Life* 7(3): 288-298.
- Satyaningtjas AS, Maheswari H, Achmadi P, Pribadi WA, Hapsari S, Jondriatno D, Bustaman I, Kiranadi B. 2014. Kinerja Reproduksi Tikus Bunting Akibat Pemberian Ekstrak Etanol Purwoceng. *Jurnal Kedokteran Hewan* 8(1): 35-37.
- Setiawan H, Wulandari SW, Aruan SY, Prihandana PR 2022. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Pepaya Calina terhadap Indeks Gonadosomatik dan Perkembangan Folikel Ovarium Tikus Wistar. *Acta Veterinaria Indonesiana* 10(3): 245-252.
- Sitasiwi AJ, Mardiaty SM. 2016. Antifertility Effects of Water Extract from Carica papaya Seeds on the Regularity of the Estrus Cycle of Mice (*Mus musculus* L.). *Anatomy and Physiology Bulletin* 1(1): 68-74.
- Sitasiwi AJ, Mardiaty SM, Isdadiyanto S, Subagio A, Taufiq HR. 2023. The Ethanolic Neem Leaf Extract Nanochitosan (ENLEN) Effect on Sprague Dawley Rats Sperm Morphology. *AIP Conference Proceeding* 2738(1).
- Soraya C, Wulandari F. 2019. Efek antibakteri Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* secara In-vitro. *Cakradonya Dental Journal* 11(1): 23-32.
- Ujah II, Nsude CA, Ani ON, Alozieuwa UB, Okpako IO, Okwor AE. 2021. Phytochemical Of Neem Plant (*Azadirachta indica*) Explains Its Use In Traditional Medicine and Pest Control. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences* 14(2):165-171.