

Gambaran Leukosit Setelah Pemberian Nanoenkapsulasi Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) pada Burung Puyuh Pascainduksi Imunosupresan Deksametason

(LEUCOCYTES PROFILE AFTER SUPPLEMENTATION OF NANOENCAPSULATION ZANTHOXYLUM ACANTHOPODIUM IN QUAILS POST INDUCTION BY DEXAMETHASONE IMMUNISUPRESANT)

Rasyida Ulfa¹, Akhiruddin Maddu²,
Huda Salahuddin Darusman³, Koekoeh Santoso³

¹Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,
Fakultas Kedokteran Hewan,

²Departemen Fisika,

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

³Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,
Fakultas Kedokteran Hewan,.

Jl. Agatis, Kampus IPB, Babakan, Dramaga,

Bogor, Jawa Barat 16680, Indonesia.

Telp. 0251-8629469; E-mail: rasyidaulfa2@gmail.com

ABSTRAK

Penggunaan AGP (*Antibiotic Growth Promoter*) pada hewan telah dilarang karena risiko resistensi antibiotik. Andaliman dapat digunakan sebagai alternatif pengganti AGP. Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) merupakan tanaman herbal yang terbukti memiliki efek imunomodulator. Namun tanaman herbal memiliki bioavailabilitas yang rendah dalam tubuh, maka diperlukan alternatif untuk meningkatkan bioavailabilitas dengan cara memperkecil ukuran partikel menggunakan teknologi nanopartikel. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan efek ekstrak andaliman, dan nanopartikel andaliman pada diferensiasi leukosit, jumlah leukosit dan indeks rasio H/L. Penelitian menggunakan 24 ekor burung puyuh, yang dibagi menjadi empat kelompok. Kelompok K diberikan kontrol imunosupresan menggunakan deksametason, Kelompok P1 diberikan ekstrak andaliman; kelompok P2 diberikan nanopartikel andaliman, dan kelompok P3 diberikan nanoenkapsulasi andaliman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian Andaliman memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap diferensial leukosit, jumlah leukosit dan rasio H/L setelah induksi dengan imunosupresan. Rata-rata jumlah total leukosit adalah K (8080 sel/mm³), P1 (20040 sel/mm³), P2(20440 sel/mm³), dan P3 (22040 sel/mm³). Rata-rata persentase limfosit adalah K (44,6%), P1 (53,6%), P2(57,4%), dan P3 (65,8%). Rata-rata persentase heterofil adalah K (50,6%), P1 (41,8%), P2 (37,8%), dan P3 (28,6%). Rata-rata persentase monosit adalah K (2,8%), P1 (4,6%), P2(4,8%), dan P3 (5,0%). Rata-rata rasio H/L adalah K (1,1), P1 (0,7), P2(0,6), dan P3 (0,5). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak andaliman, nanopartikel andaliman dan nanoenkapsulasi andaliman dapat meningkatkan jumlah leukosit, diferensial leukosit dan menurunkan rasio H/L.

Kata-kata kunci: andaliman; deksametason; gambaran leukosit; nanoenkapsulasi; burung puyuh

ABSTRACT

The use of AGP (*Antibiotic Growth Promoter*) in animal has been banned because of the risk of antibiotic resistance. As an alternative for growth promoter. Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) were used as feed additives. Andaliman is an herbal plant which proven has an immunomodulatory effect. However, herbal plants have low bioavailability in the body, so we need to increase its bioavailability by reducing particle size using nanoparticle technology. The aim of our study was to determine the effects of three forms of andaliman as extracts, nanoparticles and nanoencapsulation on leukocyte differential, leukocyte count and Heterophil (H) / Lymphocyte (L) ratio index. In this study we used 24 quails, which is

divided into 4 groups, consist of 4 birds each. Group K was control group, birds were given dexamethasone (immunosuppressant), group P1 was given dexamethasone and andaliman extract, group P2 was given dexamethasone and andaliman nanoparticles, whilst group P3 was given dexamethasone and andaliman nanoencapsulation. The results showed that andaliman consumption had a significant effect ($P < 0.05$) on differential leukocytes, number of leukocytes and H / L ratio after induction with immunosuppressants. Total leukocytes count based on the given treatment were K (8080 cell/mm³), P1 (20440 cell/mm³), P2 (20440 cell/mm³), and P3 (22040 cell/mm³). Each mean lymphocytes were K (44,6%), P1 (53,6%), P2(57,4%), and P3 (65,8%). Each mean heterophile were K (50,6%), P1 (41,8%), P2 (37,8%), and P3 (28,6%). Each mean monocytes were K (2,8%), P1 (4,6%), P2(4,8%), and P3 (5,0%). Each mean ratio index Heterophile (H) / Lymphocyte.(L) were K (1,1), P1 (0,7), P2(0,6), and P3 (0,5). It could be concluded that administration of Andaliman extract, Andaliman nanoparticles and Andaliman nanoencapsulation can increase the number of leukocytes, differential leukocytes and decrease the H / L ratio.

Keywords: Andaliman; dexamethasone; profile leucocyte; nanoencapsulation; quail

PENDAHULUAN

Ternak unggas salah satunya puyuh memiliki nilai komoditas unggul dalam prospek pasar di Indonesia. Peternak puyuh berupaya untuk meningkatkan produksi ternak puyuh dengan meningkatkan bobot badan salah satunya dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik telah banyak dilakukan oleh peternak unggas salah satunya adalah penggunaan *Antibiotic Growth Promotor* (AGP) merupakan antibiotik yang diberikan pada unggas untuk menghilangkan populasi bakteri yang merugikan pada tubuh agar mendapatkan bobot badan yang lebih baik. Adanya larangan penggunaan antibiotik, karena dapat menimbulkan dampak negatif pada produksi hewan dan kesehatan karena memiliki efek residu pada jaringan dan menyebabkan resistensi antibiotik ketika dikonsumsi oleh manusia (Shazali *et al.*, 2014). Para peneliti mulai mencari alternatif pengganti AGP yaitu dengan menggunakan tumbuhan. Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) merupakan suatu tumbuhan khas Sumatera Utara. Kulit buah Andaliman atau ilir-ilir, dijadikan bumbu oleh masyarakat batak, sehingga dikenal sebagai merica batak. Andaliman ternyata juga dapat dijadikan sebagai pengganti alternatif AGP karena fungsinya sebagai imunomodulator.

Andaliman dinyatakan memiliki efek stimulasi sistem imun (Purba dan Sinaga 2007), antioksidan (Suryanto *et al.*, 2004), antiinflamasi (Yanti *et al.*, 2011), antikarsinogenik (Kristanty dan Suryawati 2014), dan antibakteri (Muzafri *et al.*, 2018). Purba dan Sinaga (2007) menemukan bahwa Andaliman bermanfaat sebagai imunostimulan. Hal ini diduga karena buah Andaliman mengandung senyawa aktif yang dipercaya dapat memberikan kontribusi positif bagi kesehatan manusia, yaitu

flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Menurut Saifulhaq (2009), bahwa flavonoid merupakan salah satu senyawa kimia yang dapat memberikan efek sebagai imunostimulan karena dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh terhadap infeksi penyakit.

Tanaman obat tradisional memiliki kelarutan yang rendah dalam lemak serta daya permeabilitas kurang mampu menembus barrier absorpsi, sehingga memengaruhi bioavailabilitas senyawa bahan alam tersebut di dalam tubuh. Teknologi nanopartikel dapat digunakan sebagai alternatif untuk peningkatan kelarutan dan permeabilitas dengan cara memperkecil ukuran partikel (Ramadon dan Abdul, 2016). Nanopartikel merupakan suatu partikel padat dengan ukuran sekitar 10–1000 nm (Nikam *et al.*, 2014). Nanopartikel banyak digunakan dan aplikasi dalam bidang kedokteran dan farmasi (Mallikarjuna *et al.*, 2012). Nanopartikel memiliki keunggulan sebagai substansi antibakteri (Mitiku dan Belete 2017), antiinflamasi (Mitra *et al.*, 2012) dan aktivitas antioksidan (Keshari *et al.* 2018) dan sebagai penghantar obat (Mohammed *et al.* 2017). Penelitian ini menggunakan burung puyuh yaitu sebagai hewan coba. Puyuh merupakan hewan yang memberi respons imun spesifik dan nonspesifik dengan pemberian antigen. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui karakteristik dari nanopartikel andaliman, mengukur titer antibodi, mengamati diferensiasi sel darah putih, dan jumlah sel darah putih.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan 24 ekor burung puyuh berumur delapan minggu dengan bobot

badan antara 130-140 g. Burung-burung puyuh dalam penelitian ini dikelompokkan menjadi empat kelompok. Pada setiap kelompok terdiri dari enam ekor puyuh sebagai ulangan berdasarkan Rumus Federer. Pemberian dosis andaliman mengacu pada laporan penelitian Purbadan Sinaga (2017), sedangkan pemberian deksametason mengacu pada laporan penelitian Hanim et al. (2018). Pembagian kelompok serta perlakuan adalah sebagai berikut: K adalah Kontrol imunosupresan berupa perlakuan deksametazon 2,5 mg/kgBB; P1 adalah perlakuan deksametason 2,5 mg/kgBB + ekstrak andaliman 10,08 mg/kgBB; P2 adalah perlakuan deksametason 2,5 mg/kgBB + nanopartikel ekstrak andaliman; P3 adalah perlakuan deksametason 2,5 mg/kg BB + nanoenkapsulasi ekstrak andaliman.

Tahapan Penelitian

Burung-burung puyuh sebelum mendapat perlakuan penelitian dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari. Puyuh diberi pakan dan minum secara ad libitum. Pada hari ke-8 burung puyuh divaksinasi menggunakan antigen Sel Darah Merah Domba (SDMD) 2% secara intraperitoneal. Pada hari ke-15 dilakukan vaksinasi kembali dengan SDMD 2% sebagai booster. Sebelum divaksin, darah burung-burung puyuh diambil darah kembali untuk pengamatan pertama melihat titer antibodi dan diinduksi deksametason (Dexamethasone; PT. Indofarma Tbk; Jakarta; Indonesia) secara intramuskuler dengan dosis 2,5 mg/kgBB selama enam hari. Pada hari ke-22, seluruh burung puyuh diambil darahnya untuk pengamatan kedua. Pada hari ke-23 diberikan perlakuan ekstrak andaliman dengan dosis 10,08 mg/KgBB, nanopartikel andaliman dan nanoenkapsulasi andaliman secara oral selama tujuh hari sampai hari ke-30, lalu diambil darahnya untuk pengamatan ketiga untuk melihat diferensiasi leukosit, dan jumlah leukosit.

Pembuatan ekstrak buah andaliman

Pembuatan ekstrak andaliman yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada penelitian Muzafri *et al.* (2018) buah andaliman sebanyak 200 g dicuci lalu dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40R°C selama 24 jam lalu dihaluskan. Buah yang sudah dihaluskan ditambah dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Waktu perendaman yaitu selama 24 jam pada suhu ruang dan dilakukan pengadukan. Filtrat kemudian

disaring menggunakan kertas saring, selanjutnya filtrat ekstrak buah andaliman akan dibuat dalam bentuk nanopartikel dan nanoenkapsulasi.

Pembuatan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Andaliman

Serbuk STPP (Sodium Polyphosphate) sebanyak 0,005 g dilarutkan dalam 100 mL aquades dan menghasilkan larutan STPP lalu dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer dengan kecepatan 3000 rpm selama satu jam. Serbuk kitosan sebanyak 0,006 g dilarutkan dalam 100 mL larutan asam asetat glasial 1% lalu dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer dengan kecepatan 3000 rpm selama satu jam menghasilkan larutan kitosan. Setelah itu dicampurkan ekstrak andaliman dengan larutan kitosan dan larutan STPP dengan perbandingan larutan kitosan:STPP yaitu 6:1 dan disonikasi selama 30 menit. Nanopartikel yang dihasilkan diamati karakteristiknya menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk melihat ukuran partikel yang dihasilkan dari nanopartikel andaliman.

Pembuatan Nanoenkapsulasi Andaliman

Nanoenkapsulasi andaliman dibuat dengan penyalut kitosan menggunakan metode gelas ionik. Pembuatan nanoenkapsulasi dengan menggunakan metode yang sama dengan pembuatan nanopartikel andaliman. Setelah pembuatan nanopartikel andaliman ditambahkan larutan tween 80 lalu diaduk menggunakan magnetic stirrer dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit dan disonikasi selama lima menit. Setelah itu ditambahkan larutan kitosan, larutan maltodekstrin 9% dan larutan STPP. Setelah itu, larutan nanoenkapsulasi dikeringkan dengan menggunakan freeze drying sehingga dihasilkan serbuk nanoenkapsulasi.

Pembuatan Antigen Sel Darah Merah Domba 2%

Antigen yang digunakan untuk menguji sistem imun ayam pada penelitian ini adalah suspensi sel darah merah domba 2%. Suspensi sel darah merah domba 2% dibuat dari darah domba segar. Darah domba segar disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit hingga terpisah antara plasma dan endapan sel darah merahnya. Cairan plasma dibuang dengan menggunakan pipet. Sel-sel darah merah yang tertinggal dicampur dengan PBS pH 7,4

sebanyak 1:1, kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit hingga mengendap. Langkah pencucian tersebut diulang sebanyak tiga kali. Setelah pencucian ketiga, endapan sel darah merah dicampur dengan PBS pH 7,4 sebanyak 1:1 volume endapan sel darah merah untuk mendapatkan suspensi SDMD 50%. Selanjutnya, suspensi tersebut dapat diencerkan dengan PBS untuk mendapatkan SDMD 2%.

Perhitungan Jumlah Leukosit dan Diferensial Leukosit

Perhitungan jumlah leukosit dilakukan dengan menggunakan haemositometer. Sediaan darah dihisap menggunakan pipet leukosit dan aspirator sampai batas garis 0,1 lalu ditambahkan larutan pengencer larutan *Brilliant Cresyl Blue* (BCB) 10% hingga batas garis. Campuran dihomogenkan dengan mengocok pipet membentuk angka delapan. Campuran yang sudah homogen tersebut diteteskan ke dalam kamar hitung dengan menempelkan ujung pipet pada dasar kamar hitung yang ditutup dengan cover glass. Penghitungan leukosit dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali dengan melihat leukosit pada empat kotak besar kamar hitung (Gandasoebarta 2010).

Pengamatan terhadap diferensiasi leukosit dilakukan dengan membuat preparat ulas darah, kemudian diberi minyak emersi dan diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah masing-masing neutrophil, eosinophil, basophil, limfosit dan monosit dalam 100 leukosit yang ditemukan. Pengamatan diferensial leukosit secara manual dilakukan dengan pemeriksaan preparat ulas darah. Perhitungan rasio heterofil-limfosit dilakukan dengan menghitung jumlah heterofil dibagi jumlah leukosit. Metode yang dilakukan untuk menghitung jumlah leukosit dan diferensial leukosit dilakukan menurut (Gandasoebarta 2010).

Analisis Statistika

Analisis statistika yang digunakan pada penelitian ini menggunakan sidik ragam satu arah atau One-way Anova dengan menggunakan aplikasi SPSS 21 dan perlakuan yang berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji Duncan.

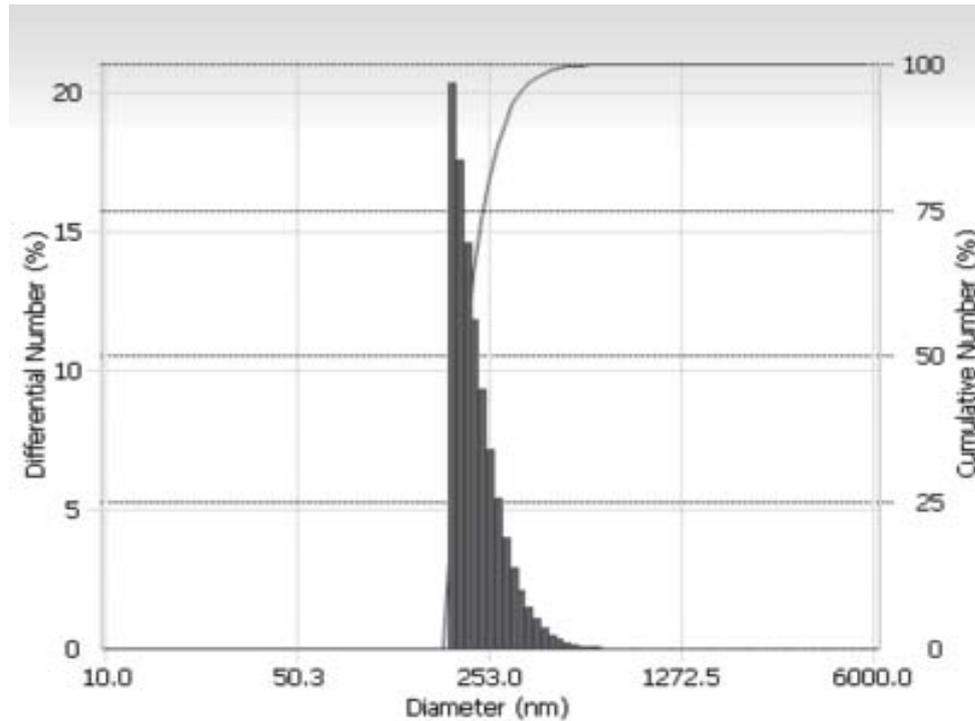
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) yang bertujuan untuk mengetahui ukuran partikel dari sampel. *Particle Size Analyzer* merupakan suatu alat yang digunakan untuk melihat ukuran dan distribusi ukuran partikel dalam nanopartikel. Berdasarkan hasil uji PSA pada Gambar 1 menunjukkan bahwa nilai rata-rata ukuran nanopartikel andaliman yaitu 229,7 nm. Mohanraj dan Chen (2006) mengemukakan bahwa nanopartikel memiliki kisaran ukuran 10-1000 nm yang berbentuk padat. Karakteristik ukuran partikel dan distribusi partikel sangat penting dalam pembuatan nanopartikel. Ukuran partikel dan distribusi ukuran dapat memengaruhi dalam pengantaran obat, pelepasan obat, dan stabilitas nanopartikel.

Karakteristik menggunakan PSA juga dapat memberikan informasi mengenai Polydispersity Index (PDI) pada nanopartikel ekstrak andaliman. Penentuan nilai indeks polidispersi digunakan untuk melihat persebaran ukuran partikel di dalam nanopartikel. Hasil pengamatan nilai indeks polidispersitas pada nanopartikel andaliman menunjukkan nilai polidispersi sebesar 0,18. Nilai tersebut menunjukkan bahwa pada nanopartikel andaliman memiliki tingkat homogenitas yang baik. Menurut Avadi *et al.* (2010), bahwa nilai indeks polidispersitas merupakan suatu karakteristik nanopartikel yang digunakan untuk melihat distribusi nanopartikel dan persebaran distribusi ukuran partikel digunakan dalam mengamati keseragaman ukuran. Polidispersitas memiliki rentang indeks yaitu berada di antara 0,1. Nilai indeks polidispersitas menunjukkan homogen jika berada pada rentang mendekati 0, nilai indeks polidispersitas menunjukkan heterogen jika berada pada rentang mendekati 0,5.

Profil leukosit

Data hasil penelitian meliputi jumlah leukosit, limfosit, monosit, heterofil pada puyuh yang telah diinduksi deksametason dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa pemberian andaliman dapat memberikan pengaruh nyata ($p < 0.05$) terhadap beberapa parameter yang diamati. Berdasarkan hasil yang didapat bahwa pemberian andaliman dapat meningkatkan sistem imun setelah diberikan imunosupresan berupa deksametason. Kandungan senyawa



Gambar 1. Hasil analisis *Particle Size Analyzer* (PSA) pada sampel andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) menunjukkan rata-rata ukuran 229,7 nm

kimia dalam andaliman salah satunya flavonoid dapat meningkatkan sistem imun karena mempengaruhi proliferasi limfosit dan *interleukin 2* (IL-2) sehingga dapat dijadikan sebagai imunomodulator.

Flavonoid memiliki kemampuan meningkatkan sistem imunomodulator dengan meningkatkan efektivitas proliferasi limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga keadaan tersebut merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respons fagositosis (Santoso *et al.* 2013). Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa flavonoid mampu meningkatkan aktivasi sel efektor seperti limfosit, makrofag yang memproduksi dan melepaskan sitokin, interleukin IL-1; IL-6; IL-12; tumor nekrosis faktor alpha (TNF α). Dosis flavonoid yang lebih tinggi membuat sel leukosit (fagosit) lebih aktif terhadap sel bakteri fagosit dan lebih banyak bakteri yang dapat dirusak dan dicerna dengan sel leukosit (Zalizar 2013).

Fungsi flavonoid dapat meningkatkan jumlah limfosit T dan mempercepat proses proliferasi limfosit T. Limfosit T memproduksi sitokin berupa interferon α (IFN- α) dan interleukin 2 (IL-2). Senyawa IFN- α berperan dalam aktivasi makrofag dan dapat menginduksi

molekul major histocompatibility complex (MHC) kelas II pada makrofag, sehingga membantu fungsi makrofag untuk mengenali substansi asing. Senyawa IL-2 merupakan faktor pertumbuhan untuk sel T yang teraktivasi oleh antigen dan dapat berperan sebagai faktor pertumbuhan dan diferensiasi bagi sel B, serta dapat mengaktivasi makrofag (Roitt *et al.* 2004).

Pada Tabel 1 juga disajikan bahwa pada P3 yang diberikan perlakuan nanoenkapsulasi andaliman, ternyata memberikan pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap jumlah leukosit dan diferensiasi leukosit dibandingkan dengan kelompok P1 dan P2. Burung puyuh pada kelompok P3 diberikan nanoenkapsulasi andaliman. Nanoenkapsulasi memiliki ukuran partikel dalam bentuk nano sehingga menyebabkan proses penyalutan komponen flavonoid menjadi lebih baik karena karakteristik kitosan sebagai bahan penyalut lebih mudah untuk berikatan dengan komponen dalam bentuk nanopartikel (Grenha 2012). Menurut Gupta (2010) nanopartikel juga memiliki luas permukaan yang besar sehingga mudah masuk ke dalam usus. Burung puyuh

pada kelompok P1 hanya diberikan ekstrak andaliman, hal tersebut diduga karena ekstrak andaliman memiliki ukuran partikel yang lebih besar dibandingkan dengan nanopartikel, sehingga sulit untuk mencapai organ target.

Nanoenkapsulasi merupakan suatu teknologi nanopartikel dengan ukuran partikel 10-1000 nm. Proses penyalutan bahan aktif senyawa kimia dengan menggunakan teknologi nanopartikel yang bertujuan sebagai *drug delivery system*. Proses pembuatan nanoenkapsulasi menggunakan bahan penyalut yang relatif lebih stabil dan berasal dari alam, bahan penyalut yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan dan maltodekstrin. Kitosan merupakan bahan penyalut yang digunakan dalam pembuatan nanoenkapsulasi yang bersifat *bioavailability*, *biocompatibility* dan *biodegradable*. Maltodekstrin merupakan bahan yang larut dalam air dan biasa digunakan sebagai bahan enkapsulasi senyawa bioaktif.

Diferensiasi Leukosit

Pada Tabel 1 disajikan bahwa diferensiasi leukosit pada perlakuan memberikan perbedaan secara signifikan ($P < 0,05$) terhadap jumlah limfosit, heterofil dan monosit. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian andaliman dapat meningkatkan jumlah leukosit setelah diinduksi dengan deksametason. Menurut laporan penelitian Purba dan Sinaga (2017) bahwa andaliman memiliki kandungan senyawa flavonoid dan dapat berperan sebagai antioksidan, sehingga mampu mencegah terjadinya stres oksidatif yang disebabkan karena ketidakseimbangan radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh.

Leukosit merupakan salah satu komponen darah yang berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh. Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat diferensiasi leukosit pada perlakuan memberikan pengaruh secara signifikan ($P < 0,05$) terhadap rata-rata jumlah leukosit, limfosit, heterofil dan monosit. Jumlah leukosit yang paling tinggi terdapat pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan jumlah leukosit pada kontrol. Menurut Sturkie dan Griminger (1976) jumlah normal leukosit pada puyuh adalah kisaran 20 - 40 ribu/mm³. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian andaliman dapat meningkatkan jumlah leukosit setelah diinduksi dengan deksametason. Menurut penelitian Purba dan Sinaga (2017), bahwa andaliman memiliki kandungan senyawa flavonoid dan sebagai antioksidan, sehingga mampu mencegah terjadinya stres oksidatif yang disebabkan karena ketidakseimbangan radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh. Menurut Suhirman dan Winarti (2013) bahwa senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam tumbuhan berpotensi sebagai imunostimulan seperti senyawa flavonoid yang berperan dalam meningkatkan sistem imun tubuh dan mampu melawan serangan bakteri, virus atau mikroorganisme lainnya. Berdasarkan Tabel 1 juga dapat diketahui bahwa pada perlakuan 3 (P3) memiliki jumlah leukosit yang paling tinggi yaitu pada perlakuan pemberian nanoenkapsulasi andaliman. Hal ini disebabkan karena nanoenkapsulasi memiliki reduksi ukuran partikel menjadi bentuk nano menyebabkan proses penyalutan komponen flavonoid menjadi lebih baik karena karakteristik kitosan sebagai bahan penyalut

Tabel 1. Rataan jumlah leukosit dan diferensiasi leukosit darah burung puyuh pada perlakuan setelah diinduksi deksametason

Parameter	Perlakuan			
	K	P1	P2	P3
Jumlah leukosit (butir/mm ³)	8080±1565 ^a	20040±2109 ^b	20440±4737 ^b	22040±2527 ^b
Limfosit (%)	44,6±3,57 ^a	53,6±2,50 ^{ab}	57,4±4,21 ^{bc}	65,8±4,60 ^c
Monosit (%)	2,8±1,30 ^a	4,6±0,54 ^b	4,8±0,44 ^b	5,0±0,54 ^b
Heterofil (%)	50,6±3,36 ^c	41,8±2,16 ^b	37,8±4,08 ^b	28,6±4,67 ^a

Keterangan: Nilai dengan superskrip berbeda menunjukkan berbeda secara nyata ($p < 0,05$). K (kontrol imunopresan), P1 (ekstrak andaliman), P2 (Nanopartikel Andaliman), P3 (Nanoenkapsulasi andaliman).

lebih mudah untuk berikatan dengan komponen dalam bentuk nano partikel (Grenha 2012). Menurut Gupta (2010) nanopartikel juga memiliki luas permukaan yang besar sehingga mudah masuk ke dalam usus.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian andaliman berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase limfosit dalam darah burung puyuh. Limfosit merupakan sel darah putih yang termasuk kedalam kelompok agranulosit. Jannah *et al.* (2007), menyatakan bahwa limfosit berperan dalam merespons adanya antigen dan stress dengan meningkatkan sirkulasi antibodi. Berdasarkan hasil pengamatan dapat diketahui bahwa kelompok P3 dengan pemberian nanoenkapsulasi dapat meningkatkan jumlah limfosit. Menurut Reis *et al.* (2006) nanoenkapsulasi memiliki ukuran partikel yang lebih kecil dibandingkan ekstrak. Ukuran partikel yang lebih kecil dapat dengan mudah masuk melalui dinding-dinding usus, sehingga mudah masuk ke dalam pembuluh darah. selain itu juga karena bahan penyalut yang digunakan adalah kitosan yang memiliki kemampuan dalam meningkatkan permeabilitas membran sel. Selain itu, pemberian andaliman dapat meningkatkan jumlah limfosit. Menurut Senas dan Yunitalinawati (2012) limfosit yang aktif menghasilkan limfokin dan IL-2 berfungsi memicu proliferasi limfosit. Senyawa IL-2 diproduksi oleh sel T helper dan dapat dirangsang produksinya dengan pemberian imunomodulator sehingga dapat meningkatkan respons imun.

Pada penelitian ini persentase heterofil pada burung puyuh dengan pemberian andaliman berbeda nyata antar perlakuan. Heterofil yaitu bagian dari leukosit yang berperan sebagai pertahanan awal terhadap penyakit yang dapat mengakibatkan infeksi atau peradangan. Persentase heterofil pada burung puyuh yang paling tinggi terdapat pada kelompok K yaitu dengan jumlah 50 % sedangkan nilai yang paling rendah terdapat kelompok P3 yaitu dengan jumlah 26,40 %. Dalam penelitian ini jumlah heterofil pada kelompok K termasuk tinggi yaitu di atas normal. Sturkie dan Griminger (1976) menyatakan bahwa jumlah heterofil pada burung puyuh normal berkisar antara 20%-30%. Pada kelompok K burung puyuh tersebut mengalami stress oksidatif karena adanya kerusakan jaringan di dalam tubuh, akibat diinduksi dengan deksametason. Stress oksidatif yang disebabkan karena adanya radikal bebas di dalam tubuh akibat adanya kerusakan

jaringan, dapat menyebabkan munculnya respons imun lokal, peningkatan risiko infeksi dan hal tersebut akan memicu peningkatan jumlah makrofag dan heterofil pada darah burung puyuh.

Pada Tabel 1, disajikan bahwa jumlah monosit pada perlakuan mengalami peningkatan secara signifikan ($P < 0,05$), namun jumlah rataan monosit pada tiap kelompok masih berada pada kisaran normal. Hal ini sesuai pendapat Pravda (1995) yang menyatakan bahwa kisaran normal persentase monosit pada darah burung puyuh yaitu 2%-5%. Pravda *et al.* (1995) menyatakan bahwa monosit muncul ketika adanya stimulus sitokin yang dilepaskan oleh sel darah putih sehingga monosit aktif memfagositosis. Adanya peningkatan jumlah monosit pada burung puyuh karena banyak monosit berubah menjadi makrofag guna mengatasi peradangan. Fungsi makrofag untuk fagositosis, menghancurkan partikel asing serta mengubah partikel asing tersebut hingga dapat membangkitkan kekebalan.

Rasio Heterofil/Limfosit (H/L)

Rasio heterofil-limfosit adalah rasio yang menunjukkan adanya suatu indikasi stres. Hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa pemberian andaliman dapat menurunkan tingkat stress yang diinduksi deksametason pada burung puyuh. Pada Tabel 2 disajikan rasio heterofil-limfosit yang paling tinggi terdapat pada burung puyuh perlakuan kontrol yaitu dengan jumlah $1,07 \pm 0,12$. Hal ini menunjukkan adanya indikasi stress oksidatif pada puyuh. Rasio heterofil-limfosit meningkat ketika terjadi respons stres. Peningkatan rasio heterofil/limfosit dalam darah dapat dijadikan sebagai suatu petunjuk kondisi stres (Tamzil *et al.*, 2014). Menurut laporan penelitian Aengwanich dan Orawan (2003), semakin tinggi dosis deksametason yang diberikan pada burung puyuh, maka rasio H/L semakin meningkatkan pula. Indeks stress akibat kortikosteroid dapat menyebabkan reduksi atau penurunan jumlah limfosit pada organ limfonodus sehingga dapat memengaruhi sistem imun dalam tubuh, dan menyebabkan terjadinya kondisi immunosupresan.

Rasio H/L dapat meningkat setelah pemberian deksametason. Menurut Smoak dan Cidlowski (2008), bahwa deksametason sebagai obat yang bersifat immunosupresan bekerja dengan cara menurunkan dan

Tabel 2. Rasio H/L burung puyuh pada perlakuan setelah diinduksi

Perlakuan	Rasio H/L
K	1,1±0,13 ^c
P1	0,7±0,08 ^b
P2	0,6±0,13 ^b
P3	0,5±0,05 ^a

Keterangan: Nilai dengan superskrip berbeda menunjukkan berbeda secara nyata ($p < 0,05$). K (kontrol imunosupresan), P1 (ekstrak andaliman), P2 (Nanopartikel Andaliman), P3 (Nanoenkapsulasi andaliman).

menghambat limfosit dan makrofag perifer, sehingga efek dari kerja deksametason tersebut menyebabkan kematian sel pada folikel limfoid. Kelompok perlakuan yang diberikan andaliman mengalami penurunan rasio H/L, hal tersebut karena andaliman berperan sebagai antioksidan. Menurut Padayatti et al. (2003), antioksidan dapat menyumbangkan elektronnya sehingga mencegah terjadinya stres oksidatif akibat kerusakan jaringan yang disebabkan karena pemberian deksametason. Adanya senyawa flavonoid yang terkandung dalam andaliman mampu menangkal radikal bebas. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat reaksi oksidasi. Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena mampu mentransfer sebuah elektron kepada senyawa radikal bebas sehingga reaksi menjadi stabil dan dapat mencegah terjadinya stres oksidatif.

SIMPULAN

Pemberian ekstrak andaliman, nanopartikel andaliman dan nanoenkapsulasi andaliman dapat meningkatkan jumlah leukosit dan diferensiasi leukosit. Nilai rasio H/L dapat menurun ketika diberikan perlakuan andaliman pada burung puyuh yang sebelumnya telah diinduksi imunosupresan.

SARAN

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu melakukan karakteristik tambahan untuk nanopartikel andaliman serta

menganalisis imunomodulator dari molekuler lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada kepada Laboratorium Fisiologi Hewan FKH IPB, Laboratorium Fisika FMIPA IPB dan Nano Center Indonesia (NCI) yang telah membantu sehingga penelitian dapat selesai dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Aengwanic W, Orawan C. 2003. Effect of dexamethasone on differential white blood cell counts and heterophil/lymphocyte ratio in japanese quails (*Coturnix coturnix Japonica*). *Journal of Science and Technology* 25(2): 183-189.
- Avadi MR, Assas MMS, Nasser M, Saideh A, Fatemeh A, Rassoul D, Mateza R. 2010. Preparation and characterization of insulin nanoparticle using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6: 58-63.
- Gandasoebrata R. 2010. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta. Dian Rakyat. Hlm 25-30
- Grenha A. 2012. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting* 20: 291-300.
- Gupta PK, Pandit JK, Kumar A, Swaroop P, Gupta S. 2010. Pharmaceutical nanotechnology novel nanoemulsion – High energy emulsification preparation, evaluation and application. *The Pharma Research* 3: 117-138
- Guyton AC, Hall JE. 2010. *Text book of Medical Physiology*. 12th Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia. Hlm. 550-573
- Hanim R, Huda SD, Min R. 2018. Studi karakteristik tipe diabetes pada tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi deksametason. *Jurnal Veteriner* 19(1): 1-10.
- Hartoyo B, Suhermiyati S, Iriyanti N. dan Susanti E. 2016. Performan dan profil hematologis darah ayam broiler dengan suplementasi herbal (fermenherfit).

- Prosiding Seminar Nasional Teknologi dan Agribisnis Peternakan (Seri III):* Fakultas Peternakan Universitas Jendral Soedirman. Purwokerto. 19 November 2016.
- Jannah NP, Sugiharto, Isroli. 2017. Jumlah leukosit dan differensiasi leukosit ayam broiler yang diberi minum air rebusan kunyit. *J. Ternak Tropika* 18(1): 15-19.
- Keshari AK, Ragini S, Payal S, Virendra BY, Gopal N. 2018. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* 1-8.
- Kristanty RE, Abdul, Katrin. 2012. Isolation of antioxidant and xanthine oxidase inhibitor from n-butanol extract of andaliman fruit (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.). *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2(3): 376-389.
- Mallikarjuna K, Narasimha G, Dillip GR, Praveen B, Shreedhar B, Lakshmi CS, Reddy BVS, Raju BDP. 2011. Green synthesis of silver nanoparticles using ocimum leaf extract and their characterization. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 6(1): 181-186.
- Mitiku AA, Belete Y. 2017. Antibacterial and antioxidant activity of silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of *Moringa stenopetala* leaves. *African Journal of Biotechnology* 16(32): 1705-1716.
- Mitra B, Vishnudas D, Sant SB, Annamalai A. 2012. Green-synthesis and characterization of silver nanoparticles by aqueous leaf extract of *Cardiospermum helicacabum* leaves. *Drug Invention Today* 4(2): 340-344
- Mohammed MA, Jaweria TMS, Kishor MW, Ellen KW. 2017. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutical* 9(53): 1-26.
- Mohanraj VJ, Chen Y. 2006. Nanoparticles a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research Article* 5: 561-573.
- Muzafri A, Julianti E, Rusmarilin H. 2018. The extraction of antimicrobials component of andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) and Its application on catfish (*Pangasius sutchi*) fillet. International Conference on Agriculture, Environment, and Food Security IOP. Publishing IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 122(2018): 012089 Pp.1-7 doi :10.1088/1755-1315/122/1/012089
- Nikam AP, Mukesh P, Ratnapharkian, Shilpa P, Chaudhari. 2014. Nanoparticles. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences* 3(5): 1121-1127.
- [OIE] Office International Des Epizooties. 2004. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animal. world organisation for animal health 4: 258 – 269.
- Padayatty SJ, Arie K, Yaohui W, Peter E, Oran K, Jehyuk L, Shenglin C, Cristopher C, Anand D, Mark L. 2003. Vitamin C as antioxidant evaluation of its role in disease prevention. *J Am College of Nutr* 22: 18-35.
- Pravda D, Boda K, Baumgartner, Jelinek P, Kuncinsky P, Okruhlica M. 1995. Hematological parameters of japanese quail (*Coturnix coturnix Japonicum*) kept in cages under normal conditions and exposed to longtime experimental hypodynamy. *Acta Veterinaria Brno* 65: 93-97.
- Purba ST, Sinaga DP. 2017. Evaluasi potensi ekstrak tumbuhan andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) sebagai potensi imunostimulan pada tikus (*Rattus norvegicus* L.) Prosiding Seminar Biologi III. Universitas Negeri Medan. 8 September 2017.
- Ramadon D, Abdul M. 2016. Pemanfaatan nanoteknologi dalam sistem penghantaran obat baru untuk produk bahan alam. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 14(2): 118-127.
- Reis CP, Neufeld RJ, Riberio AJ, Veiga F. 2005. Nanoencapsulation methods for preparation of drug-laded polymeric nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol, Biol Med* 2: 8-21.
- Roitt IM, Delves PJ, Martin SJ, Burton DR. 2011. Roitt's *Essential Immunology*, Twelfth Edition, Chichester. Willey-Blackwell, A John Wiley & Sons, Inc. Hlm 160-165

- Saifulhaq M. 2009. Pengaruh pemberian ekstrak buah mahkota dewa dosis bertingkat terhadap proliferasi limfosit lien pada mencit BALB/C. *Biomedika* 1 2: 33.
- Santoso TA, Diniatik Kusuma AM. 2013, Efek imunostimulator ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* L Merr) terhadap aktivitas fagositosis makrofag, *Pharmacy* 10(1): 63-70.
- Senas KS, Yunita I. 2012. Pengaruh pemberian madu hutan terhadap proliferasi limfosit pada hewan uji tikus jantan galur wistar. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas* 9(2): 85-90.
- Shazali, Hooi LF, Teck CL, Di WC, Raha AR. 2014. Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia Nurhazirah. *Gut Pathogens* 6: 1.
- Smoak KA, Cidloski JA. 2008. Glucocorticoid Signaling in Health and Disease. *The Hypothalamus- Pituitary-Adrenal Axis*. Hlm. 33-53.
- Sturkie PD, Griminger P. 1976. Blood : physical characteristics, formed elements, hemoglobin and coagulation. 3rd ed. Springer, Verlag Suhirman S. dan Winarti C. 2013. Prospek dan fungsi tanaman obat sebagai imunomodulator. *Jurnal Penelitian*. 121-122.
- Suhirman S, Winarti C. 2007. Prospek dan fungsi tanaman obat sebagai imunomodulator. *Buletin Perkembangan Teknologi Tanaman Rempah dan Obat*. [Diakses 2 Maret 2020].
- Suryanto E, Sastrohamidjojo H, Raharjo S, Tranggono. 2004. Antiradical activity of andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) fruit extract. *Indonesian Food and Nutrition Progress* 2(1): 15-19.
- Tamzil MH, Noor RR, Hardjosworo PS, Manalu W, Sumantri C. 2014. Hematological response of chickens with different heat shock protein 70 genotypes to acute heat stress. *International Journal Poultry Science* 13: 14-20.
- Yanti, Pramudito TE, Nuriasari N, Juliana K. 2011. Lemon pepper fruit extract (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) suppresses the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced macrophages in vitro. *American Journal Of Biochemistry and Biotechnology* 7(4): 176-186.
- Zalizar L. 2013. Flavonoids of Phylanthus Niruri as Immunomodulators A Prospect to Animal Disease Control. *Journal of Science and Technology* 3(5): 529-532.