

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**SKRIPSI**

**PENGARUH SUB FRAKSI FLAVONOID DAUN  
*Vitex trifolia* TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS  
INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 PANDEMIK 2009**



**KRISMA AGUNG SUBARKA**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA  
DEPARTEMEN FARMAKOGNOSI DAN FITOKIMIA  
SURABAYA**

**2016**

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**SKRIPSI**

**PENGARUH SUB FRAKSI FLAVONOID DAUN  
*Vitex trifolia* TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS  
INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 PANDEMIK 2009**



**KRISMA AGUNG SUBARKA**

**051211131045**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA  
DEPARTEMEN FARMAKOGNOSI DAN FITOKIMIA  
SURABAYA**

**2016**



## SURAT PERNYATAAN

Yang bertandatangan di bawah ini saya mahasiswa skripsi :

**Nama : Krisma Agung Subarka**  
**NIM : 051211131045**

Menjelaskan dengan sesungguhnya bahwa, skripsi Dengan Judul Utama: **Pengaruh Sub Fraksi Flavonoid Daun *Vitex trifolia* Terhadap Pertumbuhan Virus Influenza A Subtipe H1N1 Pandemi 2009** merupakan penelitian yang ide dasar, serta pendanaan riset sepenuhnya dilakukan oleh dosen pembimbing skripsi yaitu: **Neny Purwitasari S.Farm., MSc., Apt. (NIP.198004192006042001)** sehingga kewenangan publikasi dan HAKI dari hasil penelitian tersebut melekat dan menjadi hak yang sah dari dosen pembimbing.

Demikian surat pernyataan ini dibuat dengan seksama untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya, sehingga kegiatan publikasi dan pengajuan HAKI yang dilakukan oleh dosen pembimbing atau ketua peneliti bukan merupakan kegiatan plagiatsm, namun tetap menyertakan nama mahasiswa yang terlibat dan dosen lain dalam anggota grup riset.

Surabaya, 10 September 2016

Mengetahui:  
Ketua Departemen  
Farmakognosi dan Fitokimia



**Dr. Aty Widyaruvanti, Apt., MSi.**  
**NIP: 196204261990022001**

Yang Membuat Pernyataan,



**Krisma Agung Subarka**  
**NIM : 051211131045**

**LEMBAR PERSETUJUAN  
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul:

**PENGARUH SUB FRAKSI FLAVONOID DAUN  
*Vitex trifolia* TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS  
INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 PANDEMIK 2009**

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet, digital library Perpustakaan Universitas Airlangga atau media lain untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi skripsi/karya ilmiah saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 17 Agustus 2016



**Krisma Agung S.**  
**NIM. 051211131045**

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Krisma Agung Subarka

NIM : 051211131045

Fakultas : Farmasi

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil skripsi yang saya tulis dengan judul :

**PENGARUH SUB FRAKSI FLAVONOID DAUN  
*Vitex trifolia* TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS  
INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 PANDEMIK 2009**

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil dari plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan/atau pencabutan gelar yang saya peroleh. Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 17 Agustus 2016



**Krisma Agung S.**  
**NIM. 051211131045**

**Lembar Pengesahan**

**PENGARUH SUB FRAKSI FLAVONOID DAUN  
*Vitex trifolia* TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS  
INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 PANDEMIK 2009**

**SKRIPSI**

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana  
Farmasi Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

**Surabaya**

**2016**

**Oleh:**

**KRISMA AGUNG SUBARKA**

**NIM. 051211131045**

**Skripsi ini telah disetujui oleh**

**Pembimbing Utama**

**Neny Purwitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.**  
NIP. 198004192006042001

**Pembimbing Serta**

**Dr. Kuncoro Puguh Santoso, drh., M.Kes**  
NIP. 196612151992031014

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi saya yang berjudul “PENGARUH SUB FRAKSI FLAVONOID DAUN *Vitex trifolia* TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 PANDEMIK 2009” yang merupakan salah satu syarat guna memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Dalam proses penyelesaian skripsi ini, saya mendapatkan banyak bantuan dari berbagai pihak baik secara moral dan material. Oleh karena itu pada kesempatan ini tak lupa peneliti menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Dr. Hj. Umi Athijah, MS., Apt. selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan program pendidikan S1 Pendidikan Apoteker.
2. Dr. Aty Widyawaruyanti, MSi. Ketua Departemen Farmakognosi dan Fitokimia yang telah memberikan kesempatan dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Kepala Laboratorium *Avian Influenza Research Center* (AIRC) Universitas Airlangga Prof. Dr. C.A. Nidom., drh., M.S. yang telah menyediakan sarana dan fasilitas serta memberikan banyak masukan selama menyelesaikan skripsi ini.

4. Neny Purwitasari S.Farm., MSc., Apt., selaku pembimbing utama dan Dr.Kuncoro Pugh Santoso ,drh.,M.Kes., selaku pembimbing serta, atas segala waktu, kesabaran, ketelitian, bimbingan serta masukan selama peneliti menyelesaikan skripsi ini.
5. Dr Wiwied Ekasari, MSi., dan Drs. Abdul Rahman, MSi., selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan hingga terselesaikan skripsi ini.
6. Orang tua (Tiono dan Kasiani), kakak (Rurun Yuni Astutik), keluarga atas restu dan doa serta dukungannya sehingga saya dengan lancar menempuh pendidikan S1 Pendidikan Apoteker.
7. Dra. Esti Hendradi, Apt., M.S.I., Ph.D., Selaku dosen wali atas segala bimbingan dan perhatian selama menjalankan program pendidikan S1.
8. Seluruh staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas ilmu dan bimbingan yang diberikan selama ini.
9. Seluruh karyawan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga khususnya Ruang Praktikum Farmakognosi dan Fitokima Pak Iwan, Pak Jarwo Pak Lismo, Pak Prapto, Mbak Aini, Mas Eko yang telah membantu tenaga dan waktu selama menyelesaikan skripsi ini.
10. David Fransnado yang selalu ada, membantu menyemangati bekerja sama hingga akhirnya menyelesaikan studi S1 Pendidikan Apoteker ini.
11. Sahabat-sahabat : Amirul, Rani, Eva, Liga, Satrio, I Komang, Putu Wina, Nyoman, Putri K, Ade fili, Fauziah, Desy, Aisa, Arlita



- widya teman-teman kelas C dan Amoksilin yang bersedia membantu menyemangati dan mendukung selama empat tahun ini.
12. Apriliani selaku teman Fakultas Kedokteran Hewan yang senantiasa membantu, mengajari dan memberi semangat pada penelitian ini.
  13. Irma Zahrotul J yang selalu mendukung dan memberikan semangat tiada henti sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
  14. Teman-teman anggota Lab. AIRC Universitas Airlangga (Mbak Yuan, Mbak Uun Mbak Ire, Pak Surip, Mas Yusuf, Mbak Lia, Mbak Ulvi, Bu Ema, Mbak Anis, Mbak Irene, Mbak Mira, Ninis, Ryne, Rediana, Mei, dan Imron, dll.) atas bantuannya selama ini.
  15. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak memberikan semangat dan bantuan dalam menyelesaikan penelitian ini. Terima kasih untuk semuanya.

Tidak ada satupun kebenaran dan kesempurnaan kecuali milik Allah SWT. Semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi almamater dan dunia kefarmasian.

Surabaya, 17 Agustus 2016

Penulis

RINGKASAN

**PENGARUH SUB FRAKSI FLAVONOID DAUN  
*Vitex trifolia* TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS  
INFLUENZA A SUBTIPE H1N1 PANDEMIK 2009**

Virus influenza A subtipe H1N1 telah menjadi wabah pandemik dari virus influenza strain baru yang diidentifikasi pada bulan April 2009, yang sering kita sebut penyakit flu babi (*swine flu*). Hanya dalam waktu empat bulan, wabah pandemik telah menyebabkan banyak kematian hampir di seluruh negara di dunia dan pertama kali dideteksi di negara Meksiko. Diseluruh dunia sampai pada 4 Agustus 2009 sudah 168 negara yang melaporkan kasus influenza A H1N1 dengan 162.380 kasus positif, 1.154 diantaranya meninggal dunia. Dan data jumlah kumulatif infeksi H1N1 di Indonesia sampai dengan 23 Agustus 2009 sebanyak 1.005 orang dengan 5 orang diantaranya meninggal dunia.

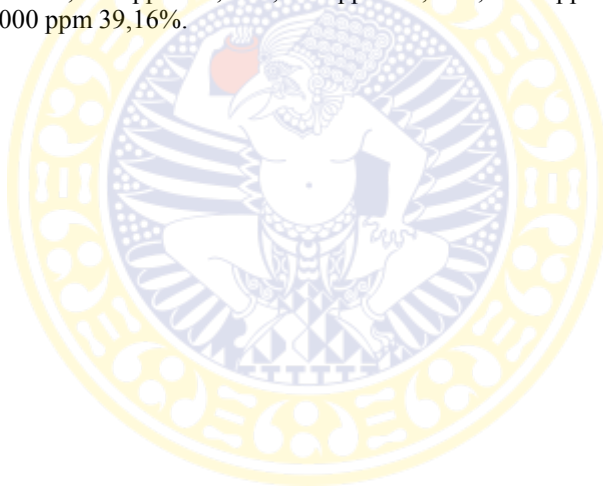
Untuk menangani penyakit akibat infeksi virus ada dua pilihan yaitu dengan vaksinasi atau menggunakan antivirus. Obat antivirus influenza akan dibutuhkan untuk mengatasi tahap awal terjadinya *outbreak*, sebagai sarana untuk individu yang terinfeksi dan sebagai terapi profilaksis. Oseltamivir dan zanamivir merupakan senyawa yang telah dikembangkan sebagai antivirus, namun efektifitasnya untuk jangka panjang terbatas karena terkait toksisitas dan munculnya mutasi virus yang resisten dan diperlukan agen antivirus baru yang lebih poten.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Sub fraksi A dan B daun *Vitex trifolia* mempunyai toksistas atau tidak terhadap Telur Ayam Berembrio (TAB) dan mengetahui sub fraksi A dan B daun *Vitex trifolia* memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan virus influenza A H1N1 pandemik 2009. Untuk melakukan uji aktivitas antivirus, virus perlu ditumbuhkan pada TAB. Telur Ayam Berembrio merupakan media yang dapat digunakan untuk pengujian antivirus. Setelah itu dilakukan Uji hemaglutinasi (uji HA) untuk mengetahui titer HA virus.

Setelah inkubasi 72 jam, hasil uji dosis aman didapatkan seluruh konsentrasi sub fraksi A yang digunakan tidak toksik terhadap TAB. Uji aktivitas antivirus dilakukan dengan

menginokulasikan virus dan sub fraksi A ke dalam TAB. TAB kemudian di inkubasi selama 72 jam. Setelah selesai inokulasi kemudian TAB dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama semalam. Setelah itu TAB diambil cairan *allantois* nya untuk dihitung titer HA virus dengan uji hemaglutinasi (HA).

Uji HA dilakukan menggunakan 0,75% *red blood cells* (RBC) marmot. Dari uji HA didapatkan titer HA 125 ppm mempunyai penghambatan terendah dan tertinggi pada konsentrasi 250 ppm selanjutnya menurun pada dosis 500 ppm dan 1000 ppm kemudian naik kembali pada dosis 2000 ppm sebagai dosis tinggi. Setelah itu dihitung persen penghambatan kemudian didapatkan data persen penghambatan 125 ppm; penghambatan sebesar 36,66%, 250 ppm 53,33%; 500 ppm 39,16%; 1000 ppm 16,66%; 2000 ppm 39,16%.



ABSTRACT

**THE EFFECT FLAVONOID SUB FRACTION OF *Vitex trifolia* LEAVES  
AGAINST INFLUENZA A VIRUSES  
SUBTYPE H1N1 PANDEMIC 2009 GROWTH**

The recent pandemic outbreak caused by the swineorigin in fluensa A/H1N1 virus in 2009. Recently resistance was occurred to the available antiviral so new antiviral drugs are needed. The objectives of this study were to investigate antiviral activity of flavonoid sub fraction *Vitex trifolia* leaves to in embryonated chicken egg infected with influenza A viruses subtype H1N1 pandemic-2009. *Vitex trifolia* leaves were extracted using maceration and fractionation using chromatography fast column method. Toxicity test of flavonoid sub fraction was evaluated in embryonated chicken egg. Antiviral activity was performed in embryonated chicken egg and evaluated by hemagglutination (HA) test. The mean of HA titre will be used to calculate inhibitory percentage of flavonoid sub fraction as an antiviral. Results concluded that flavonoid sub fraction did not show any toxic effect in embryonated chicken egg in concentration. Flavonoid sub fraction also showed its effect to reduce viral HA titre, on influenza A viruses subtype pandemic-2009 H1N1, compared to the negative control. The percentage of inhibition of this flavonoid sub fraction against pandemic-2009 H1N1 influenza A virus is 53.33% at concentration 250 µg/mL. In conclusion flavonoid sub fraction of *Vitex trifolia* leaves exhibited antiviral activity against influenza A viruses subtype pandemic-2009 H1N1.

**Keywords:** *Vitex trifolia*, influenza A, H1N1, embryonated chicken egg, hemagglutination test.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	vi
RINGKASAN .....	ix
ABSTRAK .....	xi
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR GAMBAR .....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xviii
DAFTAR SINGKATAN .....	xix
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	8
1.3. Tujuan Penelitian .....	8
1.4. Manfaat Penelitian .....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	9
2.1. Tinjauan Tentang Tanaman <i>Vitex trifolia L.</i> .....	9
2.1.1. Deskripsi Tanaman.....	9
2.1.2. Nama Daerah .....	10
2.1.3. Penyebaran Tanaman .....	10
2.1.4. Klasifikasi Tanaman .....	10
2.1.5. Nama Sinonim <i>Vitex trifolia</i> .....	11
2.1.6. Kandungan Tanaman Dan Efek Farmakologi	11

2.2. Tinjauan Tentang Metode Ekstraksi .....	13
2.2.1. Definisi Ekstraksi .....	13
2.2.2. Definisi Ekstrak .....	13
2.2.3. Metode Ekstraksi .....	13
2.3. Tinjauan tentang Fraksi .....	16
2.4. Tinjauan Tentang Obat Antiviral .....	17
2.4.1. Inhibitor Neuraminidase (Oseltamivir Dan Zanamivir) .....	17
2.4.3. Amantadine dan Rimantadin .....	19
2.5. Tinjauan Tentang Vaksinasi .....	21
2.6. Tinjauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	22
2.6.1. Definisi KLT .....	22
2.6.2 Penggunaan KLT .....	22
2.7. Tinjauan Tentang Virus .....	24
2.8. Tinjauan Tentang Virus Influenza .....	24
2.8.1. Definisi Virus Influenza .....	24
2.8.2. Virus Influenza A Subtipe H1N1 Pandemi-2009 .....	28
2.8.3. Replikasi Virus Influenza .....	28
2.8.4. Mekanisme Virus Avian Influenza Masuk ke dalam sel Hospes .....	30
2.9. Tinjauan Uji Antivirus Influenza .....	33
2.9.1. Uji Neuramidase (NA) .....	33
2.9.2. Uji Hemaglutinasi (HA) .....	34
2.9.3. Uji Inhibisi / Reduksi Plaque .....	35

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL .....	37
BAB IV METODE PENELITIAN .....	43
4.1. Variabel Penelitian .....	43
4.1.1. Variabel Bebas .....	43
4.1.2. Variabel Tergantung .....	43
4.1.3. Variabel Kontrol .....	43
4.2. Bahan .....	44
4.2.1. Bahan Uji .....	44
4.2.2. Virus dan Media Pengujian .....	44
4.2.3. Bahan Kimia .....	44
4.3. Alat .....	45
4.4. Prosedur Kerja .....	45
4.4.1. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun <i>Vitex trifolia</i> L. ....	45
4.4.2. Prosedur Kromatografi Kolom Vakum dari Fraksi Etil Asetat Daun <i>Vitex trifolia</i> . ....	46
4.4.3. Pembuatan Phospate Buffer Saline (PBS) .....	48
4.4.4. Pengenceran Larutan Induk Sub Fraksi Daun <i>Vitex</i> <i>Trifolia</i> .....	48
4.4.5. Menentukan Dosis Aman dari Sub Fraksi Daun <i>Vitex</i> <i>trifolia</i> L .....	49
4.4.6. Pembuatan Sel Darah Merah Marmot 0,75%.....	53
4.4.7. Uji Hemaglutinasi .....	54
4.4.8. Analisis Data .....	55
BAB V HASIL PENELITIAN .....	57
5.1. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun <i>Vitex trifolia</i> Menggunakan Corong Pisah. ....	57

5.2. Pembuatan Sub Fraksi Flavonoid Menggunakan Kromatografi Kolom Vakum. ....	60
5.3. Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis. ....	60
5.4. Hasil Uji Dosis Aman sub fraksi A dan B daun <i>Vitex trifolia</i> pada TAB .....	64
5.5. Hasil Uji Aktivitas sub Fraksi A daun <i>Vitex trifolia</i> Pada Telur Ayam Berembrio (TAB) Terhadap Virus Influenza A Subtipe H1N1 Pandemi 2009. ....	66
5.6. Hasil Uji Hemaglutinasi (HA) pada Virus Influenza A Subtipe H1N1 Pandemi 2009. ....	68
BAB VI PEMBAHASAN .....	71
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN .....	81
7.1. Kesimpulan .....	81
7.2. Saran .....	81
DAFTAR PUSTAKA .....	82
LAMPIRAN .....	91



**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
Tabel 2.1 Gen Influenza dan Fungsinya .....	26
Tabel 5.1 Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun <i>Vitex trifolia</i> .....	57
Tabel 5.2 Kode Sub Fraksi dan Perbandingannya .....	59
Tabel 5.3 Hasil uji dosis aman larutan fraksi daun <i>Vitex trifolia</i> pada TAB pada Sub Fraksi A .....	65
Tabel 5.4 Hasil uji dosis aman larutan fraksi daun <i>Vitex trifolia</i> pada TAB pada Sub Fraksi B .....	65
Tabel 5.5 Pengamatan pada TAB setelah injeksi virus influenza A subtipe H1N1 Pandemik 2009 dan sub fraksi A daun <i>Vitex trifolia</i> .....	67
Tabel 5.6 Hasil uji HA pada uji aktivitas terhadap virus influenza A subtipe H1N1 Pandemik 2009.....	69

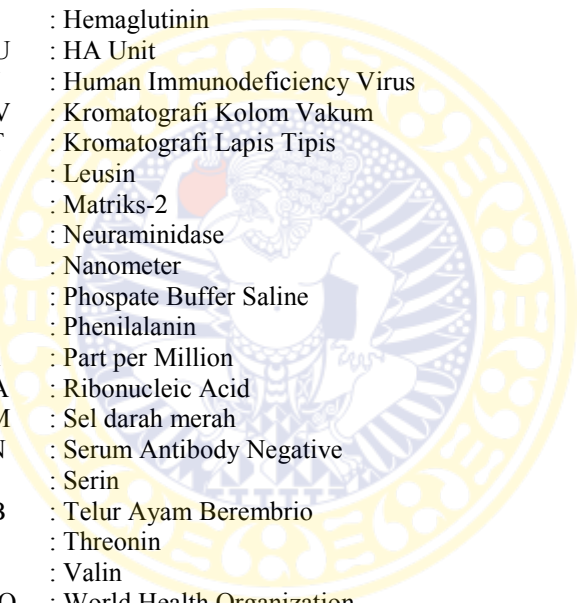
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 <i>Vitex trifolia L</i> .....	9
Gambar 2.2 Struktur Molekul dari Vitexin .....	12
Gambar 2.3 Alat Soxhlet .....	16
Gambar 2.4 Struktur oseltamivir (a) dan zanamivir (b).....	19
Gambar 2.5 Struktur amantadine (a) dan rimantadine (b) .....	21
Gambar 2.6 Struktur virus influenza A .....	27
Gambar 2.7 Replikasi Virus Influenza .....	30
Gambar 2.8 Proses Replikasi Virus dan Antivirusnya .....	32
Gambar 2.9 Aglutinasi sel darah merah oleh virus influenza .....	35
Gambar 3.1 Alur Kerangka Konseptual .....	42
Gambar 4.1 Pengenceran berseri .....	49
Gambar 4.2 Inokulasi Telur Ayam Berembrio dan pemanenan cairan allantois .....	51
Gambar 4.3 <i>Well Plate-96</i> .....	54
Gambar 4.4 Interpretasi Hasil Titrasi Uji HA Dalam 96 Well Plate ..55	
Gambar 4.5 Kerangka Operasional .....	56
Gambar 5.1 Pemisahan Sub Fraksi 1,2,3 dan 4 .....	60
Gambar 5.2 Pemisahan Sub Fraksi 5,6,7 dan 8 .....	61
Gambar 5.3 Pemisahan Sub Fraksi 9, 10 dan 11 .....	62
Gambar 5.4 Grafik Presentase Penghambatan sub fraksi A legundi terhadap virus H1N1 Pandemik 2009 .....	70

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Skema Prosedur Fraksinasi Daun Vitex trifolia L. ....	91
2. Skema Prosedur Kromatografi Kolom Vakumsub fraksi .....	92
3. Skema prosedur kerja pembuatan larutan induk .....	93
4. Skema prosedur kerja uji dosis aman dan pemilihan konsentrasi sub fraksi .....	94
5. Skema prosedur kerja Inokulasi Pada TAB .....	95
6. Skema prosedur kerja Uji Hemaglutinasi (HA Test) .....	96
7. Titer HA Hasil Uji Hemaglutinasi .....	97
8. Proses Pembuatan Fraksi Legundi .....	98
9. Proses Uji Aktivitas pada TAB .....	99
10. Perbandingan Uji Flavonoid antara fraksi etil asetat dan Etanol 95% Sebagai dasar pemilihan pelarut .....	101

**DAFTAR SINGKATAN**



Ala	: Alanin
Arg	: Arginin
Asn	: Asparagin
DMSO	: Dimetilsulfoksida
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
Glu	: Glutamat
G	: Glisin
HA	: Hemaglutinin
HAU	: HA Unit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
KKV	: Kromatografi Kolom Vakum
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
Leu	: Leusin
M2	: Matriks-2
NA	: Neuraminidase
nm	: Nanometer
PBS	: Phosphate Buffer Saline
Phe	: Phenilalanin
ppm	: Part per Million
RNA	: Ribonucleic Acid
SDM	: Sel darah merah
SAN	: Serum Antibody Negative
Ser	: Serin
TAB	: Telur Ayam Berembrio
Thr	: Threonin
Val	: Valin
WHO	: World Health Organization
$\mu\text{L}$	: Mikroliter
$\mu\text{M}$	: Mikromolar

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1.Latar Belakang Masalah

Virus influenza merupakan anggota dari keluarga Orthomyxoviridae, Genus Influenza A ditandai dengan patogenesis kompleks karena variabilitas genetik. Salah satu ciri khas dari virus influenza yaitu mutasi gen yang sering disebabkan karena pertukaran segmen gen lengkap atau mutasi (Lombardo *et al.*, 2015). Virus influenza A subtipe H1N1 yang ada sekarang merupakan kombinasi dari gen virus influenza pada babi, burung dan manusia. Virus influenza A mempunyai kemampuan untuk mengalami mutasi. Mutasi ini bisa terjadi melalui mekanisme *antigenic drift* maupun *antigenic shift*, dimana akan menghasilkan strain virus influenza baru yang lebih resisten (Spackman, 2008).

Berdasarkan hubungan antigen mereka, strain virus influenza A diklasifikasikan menjadi subtipe serologis glikoprotein permukaan primer yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) (Phing *et al.*, 2015). Hemagglutinin memiliki peran penting dalam proses penempelan (*attachment*) partikel virus ke reseptor permukaan sel inang yang mengandung *sialic acid* (SA). Setelah menempel, *envelope* virus akan bergabung (*fuse*) dengan membran sel inang sehingga penetrasi virus ke sel inang terjadi (King *et al.*, 2009). Neuraminidase berfungsi sebagai enzim yang memisahkan antara molekul H dengan *sialic acid* dari molekul N yang lain, dan dari glikoprotein dan glikolipid pada permukaan sel.

Neuraminidase merupakan molekul target dari senyawa inhibitor neuraminidase yang akan memotong reseptor selular residu *sialic acid*. Pemotongan ini melepaskan virus-virus, yang nantinya akan menyerang sel-sel baru. Tanpa neuraminidase, infeksi akan dibatasi pada satu putaran replikasi, yang cukup jarang menyebabkan penyakit (Rahdiansyah, 2010).

Penyakit flu babi pertama kali terjadi pada tahun 1918 dikenal sebagai “*Spanish Flu*” menyebabkan kematian lebih dari 50 juta manusia di seluruh dunia dan dinyatakan sebagai wabah pandemik dalam kurun waktu satu tahun, yaitu tahun 1918-1919 (Rahdiansyah, 2010). Pada kenyataannya, virus influenza A masih menimbulkan masalah utama bagi kesehatan manusia dan tidak dapat diberantas karena besarnya reservoir alami virus tersebut. Hingga kini, pengenalan gen virus avian terhadap populasi manusia dapat terjadi setiap waktu dan memungkinkan terjadinya peningkatan pandemik baru (Ehrhardt *et al.*, 2007). Pada tanggal 29 April 2009, World Health Organization (WHO) dideteksi pada minggu sebelumnya dan dengan cepat menjadi pandemi fase 5. Fase 5 mengindikasikan transmisi virus dari manusia ke manusia dari strain influenza yang berasal dari hewan dari satu bagian negara di dunia dan dengan cepat menyebar ke bagian lain di dunia (Maryanto *et al.*, 2011). Beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa virus pandemi H1N1-2009 cukup berbahaya, mudah menular dan dapat menimbulkan kematian karena virus ini lebih berbahaya dibanding virus influenza musiman, seperti virus influenza A H1N1, H2N1, H3N1 dan H3N2 (Krisnawan, 2011).

Diseluruh dunia sampai pada 4 Agustus 2009 sudah 168 negara yang melaporkan kasus influenza A H1N1 dengan 162.380 kasus positif, 1.154 diantaranya meninggal dunia (DepKes, 2009). Dan data jumlah kumulatif infeksi H1N1 di Indonesia sampai dengan 23 Agustus 2009 sebanyak 1.005 orang dengan 5 orang diantaranya meninggal dunia (Maryanto *et al.*, 2011). Kasus tahun 1997 merupakan kasus pertama kali adanya penularan langsung virus avian influenza dari spesies unggas ke manusia yang berakibat fatal. Virus tersebut kemudian menyebar tidak hanya di kawasan Asia, akan tetapi juga di kawasan Eropa dan Afrika. Berdasarkan data dari WHO sampai 10 Desember 2013 total kasus avian influenza pada manusia berjumlah 648 kasus dengan 384 kematian yang keseluruhannya terjadi pada 15 negara (Garjito, 2013). Namun dengan bertambahnya dua kasus yang telah tercatat, sejak tahun 2005 hingga Maret 2015, jumlah kumulatif kasus Flu Burung (H5N1) di Indonesia adalah 199 kasus dengan 167 kematian (Depkes, 2015).

Walaupun vaksinasi adalah pilihan terbaik untuk melindungi dari infeksi pada virus influenza, pendekatan ini sulit dilakukan, vaksin dan antivirus kimia sintesis mulai mengalami resistensi karena banyak muncul *strain* virus baru yang spesifik. Pengobatan dengan amantadine dan turunannya mempunyai hasil cepat dalam munculnya varian yang resisten dan tidak direkomendasikan untuk penggunaan umum yang tidak terkendali (Ehrhardt *et al.*, 2007). Seperti penyakit virus lainnya, sebenarnya penyakit ini belum ada obat yang efektif. Penderita hanya akan

diberi obat untuk meredakan gejala yang menyertai penyakit flu itu, seperti demam, batuk atau pusing. Food and Drug Administration (FDA) Amerika Serikat telah merekomendasikan 4 (empat) jenis obat antiviral untuk pengobatan dan pencegahan influenza A. Jenis obat tersebut diantaranya adalah M2 inhibitors (amantadin dan rimantadin) dan neuraminidase inhibitors (oseltamivir dan zanamivir). Keempat obat ini dapat digunakan yang biasa kita kenal (*seasonal influenza*). Selain digunakan dalam pengobatan, oseltamivir juga dapat dimanfaatkan sebagai profilaksis atau pencegahan terhadap penyakit flu burung (Depkes, 2007).

Kewaspadaan terhadap virus pandemi H1N1-2009 semakin meningkat ketika dilaporkan bahwa virus tersebut telah resisten terhadap beberapa obat antivirus yang digunakan dalam pencegahan ataupun pengobatan influenza seperti oseltamivir (Calatayud, 2011). Sedangkan resistensi pada turunan *adamantane* terjadi karena adanya substitusi asam amino tunggal pada urutan 26 (Leu→Phe), 27 (Val→Ala atau Thr), 30 (Ala→Thr atau Val), 31 (Ser→Asn atau Arg) dan 34 (G→E) dalam domain trans membran M2 (Dharmayanti *et al.*, 2010). Resistensi pada golongan inhibitor neuraminidase terjadi karena substitusi satu asam amino pada neuraminidase (NA), yaitu mutasi H274T (Mahardika, 2008). Pengembangan obat antivirus yang lebih potensial sangat diperlukan untuk mengatasi virus H1N1 pandemik yang telah menunjukkan resistensi terhadap beberapa jenis obat yang ada di pasaran.



Pengobatan herbal, secara umum lebih aman daripada obat kimia konvensional dan memiliki kemungkinan lebih kecil untuk terjadi resistensi virus karena fungsi beragam yang dimiliki. Selain itu, sediaan herbal tertentu tidak hanya ditujukan untuk virus tetapi juga untuk mengatasi gejala influenza tersebut (Hudson, 2009). Di Indonesia, pemanfaatan tanaman sebagai obat alam sudah sangat meluas. Dasar penggunaan obat tradisional tersebut di masyarakat berdasarkan informasi empirik. Salah satu tanaman yang mempunyai beberapa data-data ilmiah adalah tanaman legundi (*Vitex trifolia*). Tanaman ini dilaporkan mempunyai beberapa aktivitas farmakologi antara lain antibakteri, antifungi, insektisida, antikanker, analgesik, antialergi maupun antipiretik. Ekstrak heksan *Vitex trifolia* menunjukkan aktivitas trakeospasmolitik dengan metode *bioassay-guided fractionation* dapat diidentifikasi senyawa-senyawa aktifnya yaitu viteosin-A dan viteksikarpin. Viteksikarpin paling efektif menghambat proliferasi sel kanker K562, dan diduga mempunyai mekanisme aksi menginduksi apoptosis pada sel kanker tersebut melalui jalur apoptosis yang diatur oleh mitokondria (Nugroho, 2005). *Vitex rotundifolia* L milik keluarga tanaman verbenaceae, adalah tanaman obat yang banyak digunakan di Korea, Cina, dan Jepang untuk pengobatan peradangan, sakit kepala, migrain, bronkitis kronis, sakit mata, dan infeksi saluran pencernaan. *Vitex rotundifolia* telah dilaporkan menunjukkan berbagai aktivitas farmakologi seperti sitotoksik, anti-inflamasi, anti-mikroba, anti-nociceptive, dan antihiperprolaktinemia (Lee *et al.*, 2013).

Beberapa zat yang diisolasi dari sumber alami, termasuk flavonoid, telah menunjukkan efek antivirus. Senyawa flavonoid merupakan kelas terbesar dari substansi fenolik alam yang memiliki berat molekul rendah dan terdistribusi pada seluruh bagian organ tanaman (Goncalves *et al.*, 2001). Ekstrak air *Vitex trifolia* dari bagian atas tanaman dapat menghambat proses transkripsi HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (Matsui *et al.*, 2009).

Salah satu pendekatan yang digunakan untuk obat antivirus herbal yaitu dengan kemotaksonomi. Pada penelitian sesama genus *Vitex*, yaitu ekstrak dan fraksi yang kaya flavonoid dari buah dan daun *Vitex polygama* Cham (Vebenaceae) dapat meningkatkan aktivitas antiviral *dose-dependent* terhadap virus herpes simplex tipe 1 (ACV-HSV-1). Ekstrak daun menunjukkan aktivitas antivirus intraseluler sementara ekstrak buahnya mempunyai efek virusidal. Suatu fraksi dari ekstrak etil asetat daun dapat menghambat propagasi virus dengan memblok reseptor sel HEp-2 (Goncalves *et al.*, 2001).

Golongan zat yang dimiliki oleh *Vitex altissima* dengan *Vitex trifolia* yang diduga memiliki aktivitas sebagai antivirus adalah dari golongan flavonoid. Ekstrak metanol daun *Vitex trifolia* dapat menurunkan titer virus H1N1 yang dilakukan dengan uji HA dan secara *Insilico* melalui *software Molegro Virtual Docker* (MVD) telah terbukti bahwa senyawa *vitexin* yang ada dalam ekstrak methanol daun *Vitex trifolia* mempunyai *re-rank score* lebih rendah daripada zanamivir (neuraminidase inhibitor)

*Vitexin* memiliki *score* -95,6056 kcal/mol dan zanamivir -111,423 kcal/mol. Semakin rendah (negatif) nilai *re-rank score*, maka dapat dikatakan bahwa ikatan reseptor-ligan semakin stabil dan dari hasil tersebut dapat dikatakan *Vitex trifolia* layak untuk diteliti lebih lanjut sebagai obat antivirus baru (Hayati, 2015).

Pengujian aktivitas antivirus terhadap virus influenza A ada beberapa cara, antara lain dengan menggunakan sel *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) dan menggunakan model telur ayam berembrio (TAB). Dalam beberapa tahun terakhir, penggunaan kultur sel TAB digunakan untuk pemanfaatan dalam mengisolasi dan mengembangbiakkan virus influenza. Pemanfaatan virus ini dapat ditumbuhkan dalam telur ayam berembrio yang dapat digunakan sebagai benih virus untuk produksi sebagian besar vaksin influenza (WHO, 2011). Telur Ayam Berembrio yang digunakan berumur 10 hari, untuk pengujian aktivitas antivirusnya dengan uji hemaaglutinasi (Wang *et al.*, 2008). Uji hemaglutinasi biasanya menggunakan sel darah merah ayam, marmot, manusia golongan darah O. Bahan-bahan kimia, termasuk zat antivirus, juga dapat diinokulasikan ke dalam telur untuk mengetahui aktivitas antivirusnya (Murtini *et al.*, 2006).

Pada penelitian ini dilakukan metode fraksinasi dari ekstrak metanol daun *Vitex trifolia*, untuk mendapatkan sub fraksi yang banyak mengandung senyawa flavonoid menggunakan pelarut etil asetat. Pelarut etil asetat merupakan pelarut semi polar dan dapat melarutkan senyawa seperti flavonoid (Yuswantina, 2009). Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa ekstrak metanol

yang mengandung senyawa flavonoid dari daun *Vitex trifolia* memiliki kemampuan untuk menghambat virus dengan mekanisme neuraminidase inhibitor. Salah satu senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan menghambat virus dengan mekanisme neuraminidase inhibitor adalah *Vitexin*. Senyawa *Vitexin* ini dimiliki oleh *Vitex trifolia* (John *et al.*, 2014). Berdasarkan fakta tersebut ada kemungkinan bahwa sub fraksi flavonoid *Vitex trifolia* juga memiliki aktivitas antivirus.

### **1.2. Rumusan Masalah**

1. Berapakah dosis aman dari sub fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* yang tidak menimbulkan kematian pada Telur Ayam Berembrio?
2. Apakah sub fraksi fraksi etil flavonoid daun *Vitex trifolia* bisa menghambat pertumbuhan virus Influenza H1N1 Pandemi 2009 yang diinokulasikan pada Telur Ayam Berembrio?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui dosis aman sub fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* terhadap Telur Ayam Berembrio.
2. Mengetahui pengaruh sub fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* terhadap pertumbuhan virus Influenza H1N1 Pandemi 2009 yang diinokulasikan pada Telur Ayam Berembrio.

### **1.4. Manfaat Penelitian**

Sebagai alternatif antivirus influenza A baru subtype H1N1 Pandemi 2009 dari bahan alam yaitu daun *Vitex trifolia*.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan Tentang Tanaman *Vitex trifolia L.*

##### 2.1.1. Deskripsi Tanaman



**Gambar 2.1** *Vitex trifolia L*

(Dokumentasi Pribadi : diambil pada tanggal 24 Desember 2015.Tempat : Matera Medika Batu, Malang)

Semak, batang menunduk untuk menjalar, perakaran pada bagian bawah tumbuhan, percabangan berbulu halus ketika muda. Sebagian besar daun majemuk, bertangkai pendek atau petiolate, helai daun bulat telur (spatulate), atau melingkar, permukaan bawahnya berbulu halus, warna pada bagian bawah daun biasanya pucat hijau kusam dan lebih tua, bagian dasar halus, bagian atas daun membulat. Susunan bunga bagian poros utama terminal, daun mahkota

ungu muda menjadi biru ungu, bagian luar berbulu halus. Buah ketika kering berwarna coklat gelap, berbentuk bulat (Heim, 2015).

### 2.1.2. Nama Daerah

Lagondi, legundi, langghundi (jawa): genderasi, lagundi, lilegundi langgundi (Sumatra) (Hariana, 2013).

### 2.1.3. Penyebaran Tanaman

Dari Afrika Selatan, Asia, Australia dan Pulau Pasifik (Heim, 2015).

### 2.1.4. Klasifikasi Tanaman

Ciri Khas	: Bau aromatik khas; rasa pahit (Steenis, 2008)
Kingdom	: Plantae (Tanaman)
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida (Dicotyledons)
Ordo	: Lamiales
Suku	: Verbenaceae
Marga	: <i>Vitex</i> L.
Jenis	: <i>Vitex trifolia</i> L.

([www.plants.usda.gov](http://www.plants.usda.gov) diakses pada tanggal 19 november 2015 pada Pukul 20.00 WIB)

### 2.1.5. Nama Sinonim *Vitex trifolia*

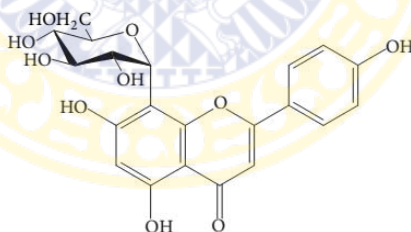
*Vitex rotundifolia* L.f. (1781), *Vitex repens* Blanco (1837),  
*Vitex lagundi* Ridley (1906) (Heim, 2015).

### 2.1.6. Kandungan Tanaman Dan Efek Farmakologi

Legundi memiliki rasa pahit, pedas, dan bersifat sejuk, beberapa bahan kimia yang terkandung dalam legundi, diantaranya Camphene, L-a-inene, silexicarpin, casticin, terpenyl acetate, luteolin-7 glucoside flavopurposid, vitrisin, dihidroksi, asam benzoate, dan vitamin A. Bahan kimia akan masuk ke meridian lever, lambung, dan kandung kencing (vesica urinaria). Efek farmakologis legundi, diantaranya sebagai obat influenza, demam, migren, sakit kepala (cephalgia), sakit gigi, sakit perut, diare, mata merah, rematik, beri-beri, batuk, luka terpukul, luka berdarah, muntah darah, eksim, haid tidak teratur, prolapses uteri, dan pembunuh serangga. Akar legundi mempunyai efek farmakologis mencegah kehamilan dan perawatan setelah bersalin. Bijinya untuk obat pereda, penyegar badan, dan perawatan rambut. Buah legundi digunakan untuk obat cacing dan peluruh haid. Sementara itu daunnya untuk analgesic, antipiretik, obat luka, peluruh kencing, peluruh kentut, pereda kejang, menormalkan siklus haid, dan germicida (pembunuh kuman) (Hariana, 2013).

Ekstrak aseton dari buah *Vitex trifolia* memiliki senyawa golongan diterpen seperti vitetrifolin B dan

vitetrifolin C, rotun-difuran, dihidrosiladagenon, dan abietatrin  $3\beta$ -ol (Meena, *et al*, 2011). Selain itu pada *Vitex trifolia* terdapat casticin, luteolin, isoorientin, alpha-pinene, linalool, terpinyl asetat, beta-caryophylline, caryophylline oksida, 5-metil artemitin, 7-desmetil artemitin, beta-sitosterol, vitetriolin, vitetrifolin A, minyak esensial bau pedas seperti limonene, humulen oksida, caryophylline oksida, alpha-humulemme, 20 hidroksidison, esidisteroid, lignan, dan flavon glikosida Pada tanaman dengan genus *Vitex* biasanya memiliki kandungan senyawa seperti vitexin, aucubin, dan casticin yang bisa dianggap sebagai marker kemotaksonomi pada genus *Vitex* (Laxmikant, 2012).



**Gambar 2.2** Struktur Molekul dari Vitexin.



## **2.2. Tinjauan Tentang Metode Ekstraksi**

### **2.2.1. Definisi Ekstraksi**

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan senyawa aktif berkhasiat obat, yang terdapat pada tanaman atau hewan, dari bagian inaktif atau inert-nya menggunakan pelarut tertentu melalui suatu proses ekstraksi. Produk yang dihasilkan relatif tidak murni dalam bentuk cairan, semisolid atau serbuk, dan hanya ditujukan untuk pemakaian per oral atau pemakaian luar (Handa *et al.*, 2008).

### **2.2.2. Definisi Ekstrak**

Ekstrak adalah sediaan yang pekat diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (FI V, 2015).

### **2.2.3. Metode Ekstraksi**

#### **a. Maserasi**

Pada proses ini seluruh serbuk simplisia direndam dalam pelarut tertentu dan dibiarkan selama waktu tertentu (minimal 3 hari) dengan pengadukan konstan hingga solut terlarut, pada suhu ruang. Campuran ini kemudian dipisahkan dengan penyaringan dan diambil bagian cairnya (Handa *et al.*, 2008).

#### **b. Infudasi**

Infudasi merupakan sebuah proses maserasi menggunakan pelarut air (dingin atau mendidih) dengan waktu yang lebih

singkat. Hasil dari infus merupakan larutan encer (Handa *et al.*, 2008).

**c. Digesti**

Digesti adalah proses maserasi yang menggunakan pemanasan ringan. Digesti dilakukan apabila proses maserasi pada suhu ruang tidak diinginkan. Tujuan dari proses ini untuk mengefisienkan pelarut (Handa *et al.*, 2008).

**d. Dekoktasi**

Dalam proses ini simplisia direbus dalam sejumlah volume tertentu air dan waktu tertentu, selanjutnya rebusan tersebut didinginkan dan disaring. Proses ekstraksi ini sesuai untuk mengekstraksi zat-zat yang larut dalam air dan yang tahan terhadap pemanasan. Perbandingan simplisia dengan air biasanya 1:4 atau 1:16; selanjutnya dilakukan perebusan hingga volume cairan tinggal seperempat semula (Handa *et al.*, 2008).

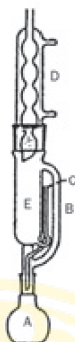
**e. Perkolasi**

Perkolasi merupakan sebuah proses ekstraksi yang paling sering digunakan untuk membuat tingtura atau ekstrak cair. Perkolasi biasanya menggunakan alat percolator. Bahan yang akan diekstraksi (dibungkus dengan kasa) direndam dengan sejumlah pelarut agar terbasahi dan dibiarkan selama lebih kurang 4 jam didalam perkolator yang pada bagian atasnya ditutup. Kemudian ditambahkan sejumlah pelarut ke dalamnya sehingga akan membentuk sebuah lapisan diatasnya dan campuran tersebut dimaserasi selama 24 jam dalam perkolator tertutup. Selanjutnya, saluran bagian bawah perkolator dibuka dan cairan ditetaskan

perlahan. Pelarut ditambahkan lagi sesuai dengan kebutuhan, hingga jumlah cairan yang ditambahkan mencapai tiga perempat volume yang dibutuhkan (Handa *et al.*, 2008).

**f. Ekstraksi Panas Kontinyu (Soksletasi)**

Pada proses ekstraksi ini, simplisia akan diletakkan dalam sebuah kantong berpori yang terbuat dari kertas saring. Kantong ini ditempatkan dalam ruang E pada alat Soxhlet. Kemudian pelarut pada bejana A dipanaskan sehingga uapnya akan terkondensasi pada kondensator D. Kondensat akan menetes pada kantong yang berisi simplisia dan akan mengekstraksi senyawa-senyawa pada simplisia. Ketika volume cairan pada ruang E telah melebihi tinggi pipa sifon C, cairan dari ruang E akan masuk kembali ke bejana A. Proses ini dilakukan berulang-ulang sampai pelarut dari tabung sifon tidak bersisa. Keuntungan dari metode ekstraksi ini dibandingkan dengan metode-metode sebelumnya adalah, dengan metode ini akan diperoleh lebih banyak zat yang terekstraksi dengan jumlah pelarut yang lebih sedikit. Tetapi metode ini tidak sesuai untuk ekstraksi senyawa yang tidak tahan pemanasan (Handa *et al.*, 2008).



**Gambar 2.3** Alat Soxhlet (Handa *et al.*, 2008)

### 2.3. Tinjauan tentang Fraksi

Fraksinasi merupakan pemisahan komponen suatu campuran misalnya ekstrak berdasarkan persamaan karakteristik fisika kimianya. Fraksinasi awal dapat didasarkan pada kelarutan sedangkan yang kedua memanfaatkan ukuran molekul senyawa.

Pemilihan metode fraksinasi tergantung faktor :

1. Sifat senyawa yang terdapat pada ekstrak
2. Memperkirakan tipe pelarut yang tepat digunakan dalam membuat ekstrak. Contoh : penggunaan air sebagai pengekstraksi digunakan pada komponen yang bersifat polar.
3. Ketersediaan dan harga pelarut serta bahan yang akan digunakan
4. Keamanan

Teknik dan bahan yang dipilih harus meminimalisir kemungkinan resiko yang terjadi, seperti tidak mudah terbakar dan tidak mudah meledak (Hendayana, 2006).

## **2.4. Tinjauan Tentang Obat Antiviral**

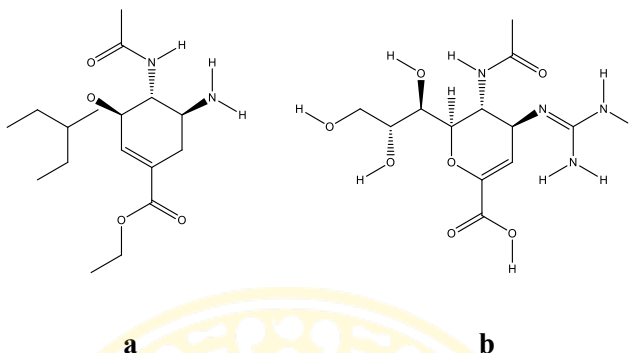
### **2.4.1. Inhibitor Neuraminidase (Oseltamivir Dan Zanamivir)**

Zanamivir dan oseltamivir merupakan obat antivirus dengan mekanisme kerja yang sama terutama terhadap virus influenza A dan B yang serupa. Keduanya merupakan inhibitor neuraminidase, yaitu analog dengan asam N-asetilneuraminat (reseptor permukaan sel virus influenza), dan desain struktur keduanya didasarkan pada struktur neuraminidase virion. Mekanisme kerja: Asam N-asetilneuraminat merupakan komponen mukoprotein pada sekresi respirasi, virus berikatan pada mukus, namun yang menyebabkan penetrasi virus ke permukaan sel adalah aktivitas enzim neuraminidase. Hambatan terhadap neuraminidase mencegah terjadinya infeksi. Neuraminidase juga penting untuk pelepasan virus yang optimal dari sel yang terinfeksi, yang meningkatkan penyebaran virus dan intensitas infeksi. Hambatan neuraminidase menurunkan kemungkinan berkembangnya influenza dan menurunkan tingkat keparahannya, jika penyakitnya kemudian berkembang.

Resistensi: kejadian resistensi disebabkan adanya hambatan ikatan pada obat dan hambatan aktivitas enzim neuraminidase. Dapat juga disebabkan oleh penurunan afinitas ikatan reseptor hemagglutinin sehingga aktivitas neuraminidase tidak memiliki efek pada pelepasan virus pada sel yang terinfeksi. Resistensi terhadap neuraminidase inhibitor sangat jarang dijumpai. Belum lama ini ditemukan kejadian resistensi selama

terapi pada pasien imunokompeten yang mendapatkan zanamivir. Resistensi terhadap oseltamivir juga ditemukan pada 0.4% pasien dewasa. Belum diketahui apakah virus yang resisten terhadap oseltamivir dapat dipindahkan (transmissible) dan bersifat patogenik. Indikasi : Terapi dan pencegahan infeksi virus influenza A dan B.

Dosis: Zanamivir diberikan per inhalasi dengan dosis 20 mg per hari (2 kali 5 mg, setiap 12 jam) selama 5 hari. Oseltamivir diberikan peroral dengan dosis 150 mg per hari (2 kali 75 mg kapsul, setiap 12 jam) selama 15 hari. Terapi dengan zanamivir atau oseltamivir dapat diberikan seawal mungkin, dalam waktu 48 jam, setelah onset gejala. Efek samping : Umumnya zanamivir dapat ditoleransi dengan baik. Efek samping yang relatif dilaporkan pada terapi zanamivir adalah gejala saluran nafas atas dan gejala saluran cerna. Namun, laporan terakhir menyebutkan bahwa zanamivir juga dapat menyebabkan batuk, bronkospasme dan penurunan fungsi paru reversibel pada beberapa pasien. Efek samping yang sering timbul dengan terapi oseltamivir adalah mual, muntah, nyeri abdomen (FarkolUI, 2012).



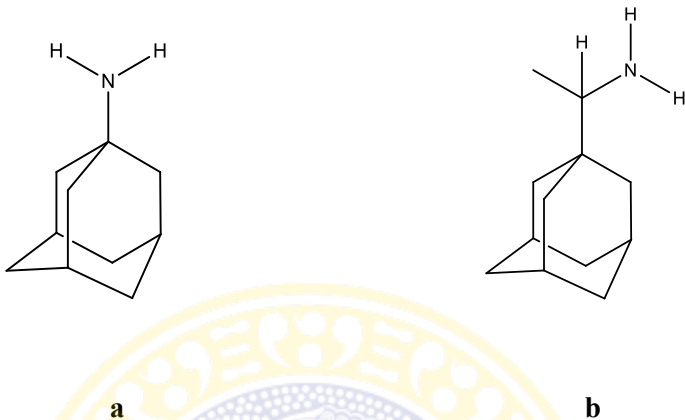
**Gambar 2.4** Struktur oseltamivir (a) dan zanamivir (b)

### 2.4.3. Amantadine dan Rimantadin

Amantadine dan Rimantadin mempunyai mekanisme kerja yang sama. Efikasi keduanya terbatas pada influenza A saja. Mekanisme Kerja : Amantadine dan Rimantadin merupakan antivirus yang bekerja pada protein M2 virus, suatu kanal ion transmembran yang diaktivasi oleh pH. Kanal M2 merupakan pintu masuk ion ke virion selama proses uncoating. Hal ini dapat menyebabkan destabilisasi ikatan protein-protein serta proses transport DNA virus ke nucleus. Selain itu, fluks kanal ion M2 mengatur pH ke kompartemen intraseluler, terutama apparatus Golgi. Perubahan kompartemental pada pH ini menstabilkan hemagglutinin virus influenza A (HA) selama transport ke intrasel. Resistensi. Mutasi pada domain transmembran protein M2 virus menyebabkan resistensi virus terhadap amantadin dan rimantadin. Indikasi : pencegahan dan terapi awal infeksi virus influenza A.

Dosis: Amantadin dan Rimantadin tersedia dalam bentuk tablet dan sirup untuk penggunaan oral. Amantadin diberikan dalam dosis 200mg/hari ( 2x100mg kapsul) sedangkan rimantadin diberikan dengan dosis 300 mg/hari (2x sehari 150mg/tablet). Dosis amantadin harus diturunkan pada pasien dengan insufisiensi renal., namun dengan rimantadin hanya perlu diturunkan pada pasien dengan klirens kreatinin  $\leq 10$  ml/ menit. Resistensi : resistensi terhadap amantadin dan rimantadin disebabkan oleh mutasi yang dapat mengubah asam amino pada kanal M2 virus. Strain virus yang resisten terhadap salah satu obat, resisten juga terhadap obat lainnya. Data terbaru menyebutkan bahwa strain yang resisten terhadap amantadin dan rimantadin sebanyak 25-35% pasien. Efek samping : Yang tersering adalah efek samping gastrointestinal ringan yang tergantung dosis. Efek samping SSP seperti kegelisahan, kesulitan berkonsentrasi, insomnia, dan kehilangan nafsu makan terjadi pada 5-33% pasien yang mendapatkan amantadin, namun lebih jarang pada rimantadin. Efek neurotoksik amantadin meningkat jika diberikan bersamaan dengan antihistamin dan obat antikolinergik/psikotropik, terutama pada usia lanjut (Farkol UI, 2012).





**Gambar 2.5** Struktur amantadine (a) dan rimantadine (b)

## 2.5. Tinjauan Tentang Vaksinasi

### Vaksinasi Influenza

Vaksinasi tahunan merupakan sarana utama mengurangi dampak influenza musiman. Saat ini, vaksin influenza musiman mengandung campuran trivalen strain dilemahkan virus influenza kemungkinan beredar selama musim flu. Karena virus influenza yang terus berubah, vaksin influenza musiman diperbarui dan diberikan setiap tahun untuk memberikan perlindungan yang diperlukan. Biasanya satu atau dua dari tiga strain virus yang digunakan dalam vaksin akan berubah setiap tahun (WHO, 2011). Terapi antiviral digunakan berdampingan dengan vaksinasi yang merupakan pendekatan logis dalam mengatasi influenza, namun

terdapat beberapa titik target dari siklus hidup virus influenza dimana replikasi virus dapat dihambat. Aktivitas antivirus virus influenza ada beberapa macam, antara lain dengan penghambatan pada pengikatan hemaglutinin (HA), penghambatan penggabungan (*Fusion*), pelepasan lapisan virus (*Uncoating*), penghambatan replikasi virus, penghambatan neuraminidase (NA) (Nidom, 2009).

## **2.6. Tinjauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

### **2.6.1. Definisi KLT**

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Fase diam pada kromatografi lapis tipis berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium atau pelat plastik. Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Gandjar dan Rohman, 2007)

### **2.6.2 Penggunaan KLT**

Penggunaan KLT secara umum adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, menentukan efektifitas pemurnian, melakukan *screening* sampel untuk obat. Penggunaan KLT antara lain untuk:

**a. Analisis kualitatif**

KLT dapat digunakan untuk uji identifikasi senyawa baku. Parameter pada KLT yang digunakan adalah nilai  $R_f$ . Dua senyawa dikatakan identik jika mempunyai nilai  $R_f$  yang sama jika diukur pada kondisi KLT yang sama. Untuk meyakinkan identifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan lebih dari 1 fase gerak dan jenis pereaksi semprot. Teknik *spiking* dengan menggunakan senyawa baku yang sudah diketahui sangat dianjurkan untuk lebih memantapkan pengambilan keputusan identifikasi senyawa (Gandjar dan Rohman, 2007).

**b. Analisis kuantitatif**

Ada dua cara yang digunakan untuk analisis kuantitatif dengan KLT yaitu dengan mengukur bercak langsung pada lempeng dengan menggunakan ukuran luas atau dengan teknik Densitometri atau dengan mengerok bercak lalu menetapkan kadar senyawa yang terdapat dalam bercak tersebut dengan metode analisis lain, misalnya dengan metode spektrofotometri. (Gandjar dan Rohman, 2007).

**c. Analisis preparatif**

Analisis preparatif ditujukan untuk memisahkan analit dalam jumlah yang banyak lalu senyawa yang telah dipisahkan ini dianalisis lebih lanjut dengan spektrofotometri atau teknik kromatografi lain. Pada KLT preparatif, sampel ditotolkan dalam lempeng dengan lapisan yang besar lalu dikembangkan dan dideteksi dengan cara non-destruktif. Bercak yang mengandung

analit yang dituju selanjutnya dikerik dan dilakukan analisis lebih lanjut (Gandjar dan Rohman, 2007).

## **2.7. Tinjauan Tentang Virus**

Semua virus memerlukan sel hidup untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan dalam sel yang berlainan dengan mekanisme pertumbuhan dan perkembangbiakan organisme lain. Oleh karena itu, virus tidak dapat dikelompokkan dengan organisme lain. Virus dibedakan berdasarkan bentuk, ada tidaknya asam nukleat di dalam virion (DNA, RNA), bentuk asam nukleatnya (ganda, tunggal, melingkar) dan adanya bagian asam nukleat dalam virion (tunggal, ganda). Virion adalah virus yang secara struktural lengkap, matang dan mampu menular. Virus berpindah dari satu sel inang ke yang lain dalam bentuk paket-paket gen, DNA atau RNA berukuran sangat kecil tetapi tidak dua-duanya. Bahan genetik tersebut terkemas di dalam selubung protein yang sangat khusus dengan bentuk yang berbeda-beda. Berdasarkan inangnya, ada tiga macam kelompok virus, yaitu : virus hewan, virus tumbuhan, dan virus bakteri (Purnomo, 2005).

## **2.8. Tinjauan Tentang Virus Influenza**

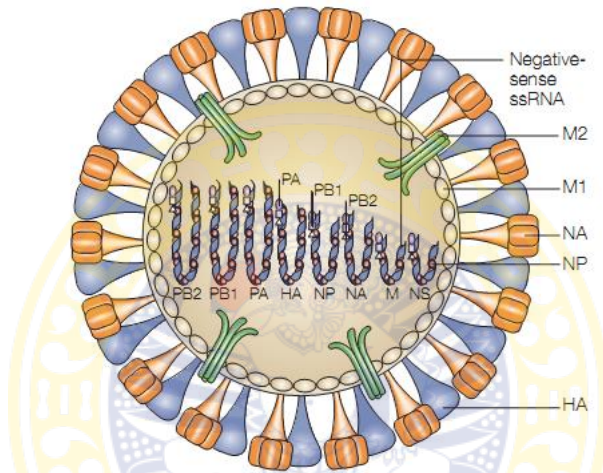
### **2.8.1. Definisi Virus Influenza**

Virus influenza diklasifikasikan dalam tipe A, B atau C berdasarkan perbedaan sifat antigenik dari nukleoprotein dan matriks proteinnya. Pada virus influenza A dan B, faktor antigenik penentu terutama berupa glikoprotein transmembran

hemagglutinin (HA) dan neuroaminidase (NA) yang mampu menimbulkan respons imun dan respons yang spesifik terhadap subtype virus. Hemagglutinin (HA) mempunyai aktifitas dalam pelekatan reseptor, sedangkan neuroaminidase (NA) mempunyai aktifitas sialidase yang dibutuhkan untuk melepas progeni virus dari permukaan. Virus avian influenza (VAI) merupakan virus influenza A terdiri atas 8 potongan RNA berpilin negative dan termasuk dalam famili Orthomyxoviridae. Virus ini pada permukaannya diselubungi oleh sekitar 500 glikoprotein. Kedelapan potongan RNA virus tersebut berukuran 13,5 kilobasa (kb) yang diselubungi oleh protein nukleokapsid, dengan panjang segmen berkisar antara 890 sampai dengan 2341 nukleotida dan terdiri dari 20-45 nukleotida non coding pada ujung 3' dan 23-61 nukleotida pada ujung 5'. Tiap-tiap segmen yang ada akan mengkode suatu protein fungsional yang penting yang terdiri atas protein polimerase B2 (PB2), protein polimerase B1 (PB1), protein polimerase A (PA), Hemagglutinin (HA), Protein nukleokapsid, Neuraminidase (NA), Protein Matriks (M) dan protein nonsruktural (NS). Dari seluruh komponen yang ada, kemudian bersama-sama akan membentuk ribonukleoprotein (RNP) (Garjito, 2013).

Segmen	Ukuran (nukleotida)	Polipeptida	Fungsi
1	2341	PB2	Transkriptase : cap binding
2	2341	PB1	Transkriptase : elongation
3	2233	PA	Transkriptase : aktivitas protease
4	1778	HA	Hemagglutinin
5	1565	NP	Nukleo Protein : berikatan dengan RNA; bagian dari kompleks transcriptase; pemindahan vrna ke nukleus/sitoplasma
6	1413	NA	Neuraminidase : pelepasan virus
7	1027	M1 M2	Protein matriks : komponen utama virion Menghubungkan protein membrane dengan jalur ion
8	890	NS1 NS2	Non structural : nucleus ; berperan pada transport RNA, splicing, translasi, protein anti interferon Baru dari nucleus

**Tabel 2.1** Gen Influenza dan Fungsinya (Garjito, 2013).



**Gambar 2.6** Struktur virus influenza A ( Horimoto, 2005)

Skema gambar virus influenza A. Pada permukaan terdapat Dua glikoprotein, hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA), dan protein ion-channel M2 yang tertanam dalam envelope virus, yang berasal dari host membran plasma. Ini terdiri ribonukleoprotein kompleks dari segmen RNA virus yang dihubungkan dengan nukleoprotein (NP) dan tiga protein polimerase (PA, PB1 dan PB2). Matriks (M1) protein dikaitkan dengan kedua ribonukleoprotein dan envelope virus. Terdiri dari 2 jumlah protein non-struktural, namun lokasinya di dalam virion tidak diketahui.

### **2.8.2. Virus Influenza A Subtipe H1N1 Pandemi-2009**

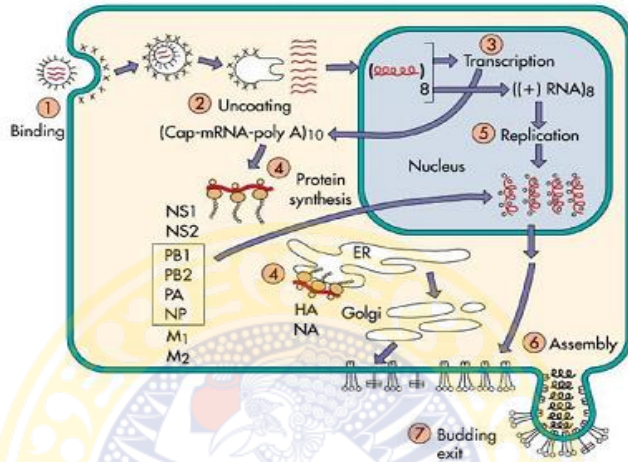
Pada tanggal 25 April 2009, Direktur Jenderal Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mengumumkan Darurat Kesehatan Masyarakat Internasional. Munculnya dan Menyebarnya virus influenza baru dengan cepat, influenza A (H1N1), menimbulkan ancaman pandemi. Pada tanggal 11 Juni 2009, WHO menyatakan bahwa pandemi influenza sedang berlangsung (Fase 6) karena ditransmisikan dari manusia ke manusia yang terjadi ditingkat masyarakat di negara-negara dalam dua atau lebih wilayah WHO. Pada tahun 2009 influenza pandemi menyebar secara internasional dengan cepat dan belum pernah terjadi sebelumnya juga virus pandemi dilaporkan di seluruh wilayah WHO dalam waktu kurang dari enam minggu. Pada 1 Agustus 2010, di seluruh dunia lebih dari 214 negara dan teritori di luar negeri atau masyarakat dilaporkan kasus yang dikonfirmasi laboratorium H1N1 pandemi influenza 2009, termasuk lebih dari 18.449 kematian (WHO 2010). Sampai tanggal 22 Juli 2009, secara kumulatif kasus influenza A H1N1 positif di Indonesia berjumlah 293 orang terdiri dari 77 laki-laki dan 65 perempuan (MenKes, 2015).

### **2.8.3. Replikasi Virus Influenza**

Proses replikasi ada 5 tahap, tahap awal virion virus influenza menempel pada reseptor sel tropisma melalui protein HA. Kedua, terjadi proses endositosis. Proses ini dapat berlangsung beberapa saat, dalam waktu 10 menit proses



endositosis sudah berlangsung 50%. Proses endositosis ini berlangsung sampai semua genom RNA virus ke luar dan masuk ke dalam sitoplasma. Ketiga, genom RNA tersebut masuk ke dalam inti sel (nukleus) dan mengalami transkripsi, guna mengubah bentuk polaritas negatif menjadi positif. Keempat, sebagian genom keluar kembali masuk ke dalam sitoplasma mengambil cap RNA sel inang dan poli A guna melakukan translasi untuk menghasilkan protein selubung (protein hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), 13 matriks dan protein non structural) yang selanjutnya digunakan untuk virus baru. Kelima, genom RNA sebanyak delapan yang berada dalam inti sel melakukan replikasi. Keenam, kedelapan segmen RNA ini dibungkus dengan protein HA, NA, M, dan NS. Untuk keperluan pelepasan virus akan terjadi penempelan pada reseptor yang akan dilakukan protein NA. Proses replikasi virus ini dapat berlangsung selama dua jam sejak terjadinya penempelan virus Influenza pada reseptor sel (Nidom, 2009).



**Gambar 2.7** Replikasi Virus Influenza (Dirita, 2007).

## 2.8.4. Mekanisme Virus Avian Influenza Masuk ke dalam sel Hospes

### a. Pelekatan virus pada permukaan sel

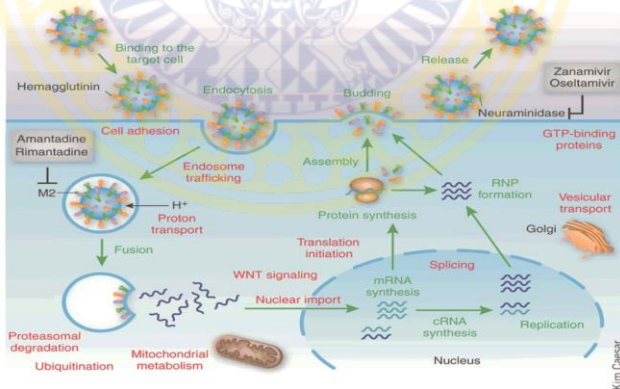
Virus influenza akan melekat dengan permukaan sel setelah terjadi percampuran antara bagian ujung terluar HA dengan asam sialat dari suatu sel glikoprotein dan glikolipid. Asam sialat kemudian akan berikatan dengan galaktose  $\alpha$  2-3 (pada unggas) atau  $\alpha$  2-6 (pada manusia) untuk mendeterminasi spesifisitas hospes. Masuknya virus ke dalam sel hospes virion akan masuk dan menyatu ke dalam sebuah ruang endosom sel hospes melalui mekanisme yang tergantung dan tidak tergantung kepada clathrin setelah berhasil melekat pada reseptor yang sesuai. Dalam ruang

ini virus tersebut mengalami degradasi dengan cara menyatukan membran virus dengan membran endosome. Proses ini dimediasi oleh pemindahan proton melalui terowongan protein dari matrix-2 (M2) virus, pada nilai pH di endosom sekitar 5,0. Selanjutnya akan terjadi serangkaian penataan ulang protein matrix-1(M1) dan kompleks glikoprotein homotrimerik HA. Sebagai hasilnya, tersingkap ranah yang sangat lipofilik dan fusogenik dari setiap monomer HA yang masuk ke dalam membran endolisomal, dan dengan demikian mengawali terjadinya fusi antara membran virus dengan membran lisomal (Garjito, 2013).

**b. Pelepasan Selubung Virus serta Sintesis RNA dan Protein Virus**Dalam proses ini, tahapan penting bagi keberhasilan virus hidup dalam hospes adalah pelepasan selubung virus dan kedelapan segmen RNA genomik dari virus, yang terbungkus dalam lapisan pelindung dari protein (ribonucleoprotein complex, RNP) nukleokapsid (N), dilepaskan ke dalam sitoplasma. Di sini mereka disalurkan ke nukleus untuk melakukan transkripsi mRNA virus dan replikasi RNA genomik melalui proses yang rumit yang secara cermat diatur oleh faktor virus dan faktor sel. Polimerase bergantung RNA (RdRp) dibentuk oleh kompleks dari PB1, PB2 dan protein PA virus, dan memerlukan RNA (RNP) yang terbungkus. Ribonukleoprotein (RNPs) akan diangkut ke dalam nukleus, dimana kompleks polimerase berikatan dengan RNA virus, yang kemudian melalui aktivitas endonuklease, RNA virus akan terbelah dan secara simultan akan memicu terjadinya

pemanjangan. Produksi RNA virus ini akan dibatasi oleh adanya nukleoprotein (NP) bagi mRNA.

Beberapa protein virus yang baru saja disintesis kemudian diangkut ke dalam nukleus dimana mereka akan berikatan dengan RNA virus untuk membentuk RNPs. Protein virus hasil sintesis baru lainnya diproses di dalam retikulum endoplasma dan perangkat golgi dimana glikosilasi terjadi. Protein yang telah termodifikasi tersebut kemudian diangkut ke dalam membran sel dimana mereka akan melekat pada lipid bilayer. Ketika konsentrasi pada membran plasma telah mencapai konsentrasi tertentu, RNPs dan protein M1 akan mengelompok membentuk partikel virus, kemudian partikel ini akan dikeluarkan dari membran dan akan dibebaskan dengan bantuan aktivitas neurominidase (Garjito, 2013).



**Gambar 2.8** Proses Replikasi Virus dan Antivirusnya (Min dan Subbarao, 2010).

### **c. Pelepasan virus**

Sel yang menghasilkan foci virus berkelompok di dalam suatu lapisan mukosa dari saluran mukosa pada saluran pernapasan, pada usus, pada lapisan endotelium, miokardium dan otak. Melalui sekresi nasal, jutaan partikel virus tiap ml akan dilepas, dimana 0,1  $\mu$ l partikel aerosol mengandung lebih dari 100 partikel virus. Pada saat awal terjadinya infeksi virus influenza, virus juga dapat ditemukan di dalam darah dan cairan tubuh lainnya. Infektifitas partikel virus dipengaruhi oleh suhu, pH, salinitas air dan radiasi ultra violet. Pada suhu 4°C waktu paruh infektivitasnya berkisar antara 2-3 minggu dalam air. Infektivitas partikel virus influenza secara mudah dapat diaktivasi menggunakan seluruh jenis alkohol sebagai desinfektan, krom dan aldehida. Temperatur diatas 70°C juga dikatakan dapat merusak infektivitas dalam waktu beberapa detik (Garjito, 2013).

## **2.9. Tinjauan Uji Antivirus Influenza**

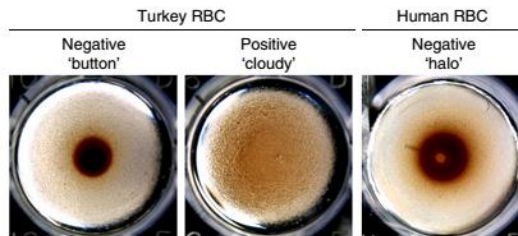
### **2.9.1. UJI Neuramidase (NA)**

Neuramidase (NA) merupakan glikoprotein kedua yang terpenting dari permukaan virus influenza. Imunitas terhadap NA berperan penting dalam perlindungan terhadap infeksi virus influenza dan antibodi anti-NA mencegah virus lepas dari sel yang terinfeksi. Pengujian dilakukan dengan cara reaksi enzimatik. Pada pengujian ini NA virus berfungsi sebagai substrat (fetuin) dan melepaskan asam sialat, kemudian reagen arsenit ditambahkan untuk menghentikan aktivitas enzimatik. Jumlah asam sialat yang

terpecah ditentukan secara kimiawi dengan asam tiobarbiturat yang memproduksi warna merah muda untuk sampel yang bebas asam sialat. Jumlah dari warna tersebut diukur dengan cara spektrofotometri pada panjang gelombang 549 nm. Pengujian aktivitas NA umumnya digunakan untuk mengetahui antibodi yang terbentuk terhadap NA virus. Kekurangan dari metode ini adalah beberapa subtype NA menunjukkan *cross* reaksi dengan tipe yang lain dan untuk pengujian ini tidak diperlukan virus influenza hidup, yang diperlukan hanya enzim NA saja (Krisnawan, 2011)

### **2.9.2. Uji Hemaglutinasi (HA)**

Pengujian Hemaglutinasi (Uji HA) merupakan pengujian paling sederhana untuk menghitung titer virus serta antibodi, prinsipnya adalah pelekatan spesifik dari antibody ke sisi antigenik pada molekul HA yang mempengaruhi pengikatan HA virus dan reseptor dengan eritrosit. Protein HA dari virus akan mengaglutinasi eritrosit. Pengujian dilakukan pada mikroplate 96 well dengan menggunakan berbagai macam sel darah merah (*Red Blood Cell* (RBC)) ayam, turkey, marmot dan manusia. Sel darah merah ayam merupakan sel darah merah yang paling banyak dipilih karena pengolahannya mudah dan cepat, polanya sangat jelas dan banyak tersedia. Tetapi karena sering menyebabkan hasil negatif, maka diganti dengan sel darah merah marmot yang lebih sensitif untuk mendeteksi virus influenza (Krisnawan, 2011).

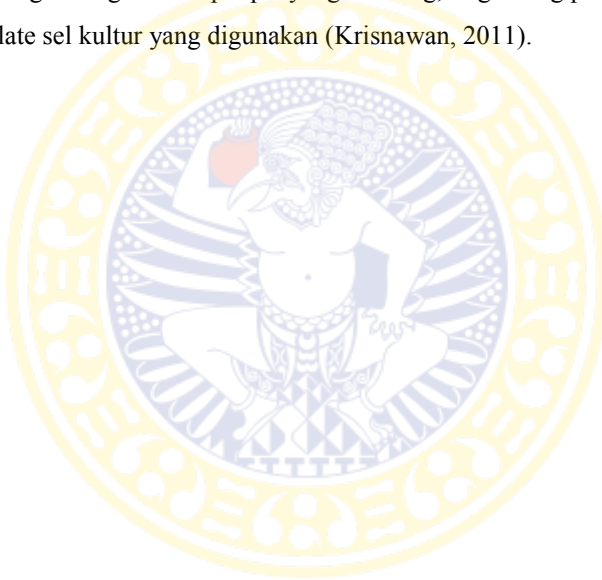


**Gambar 2.9** Aglutinasi sel darah merah oleh virus influenza (Eisfeld *et al.*, 2014).

### 2.9.3. Uji Inhibisi / Reduksi Plaque (Plaque Inhibition /Reduction assay)

Salah satu prosedur penting pada virologi adalah mengukur titer virus, yaitu mengukur konsentrasi virus pada suatu sample. Sebuah pendekatan yang banyak dilakukan untuk menentukan kuantitas dari virus yang infeksius adalah plaque assay. Untuk melakukan metode plaque assay, 10 kali dilusi dari stok virus disiapkan dan 0,1 ml aliquot diinokulasikan pada sel monolayer yang sesuai untuk pertumbuhan virus. Setelah memasuki masa inkubasi, sel kemudian ditutup dengan medium nutrient yang mengandung suatu bahan, biasanya agar, yang menyebabkan terbentuknya formasi gel. Ketika plate di inkubasi, sel yang terinfeksi melepaskan progennya virus dan penyebaran dari virus baru ke sel lain akan terhalang oleh gel. Sebagai konsekuensinya, setiap partikel yang terinfeksi akan menghasilkan zona sirkular dari sel yang terinfeksi dan itu disebut plaque. Plaque yang terbentuk cukup besar. Pewarnaan dari sel yang hidup

kadang kala digunakan untuk membantu membedakan antara sel yang hidup dengan plaque yang terbentuk. Hanya virus yang dapat dilihat kerusakannya yang dapat dilihat dengan cara ini. Titer dari virus dapat dihitung dengan plaque-forming units ( pfu ) per milliliter. Untuk menentukan titer virus, plaque dihitung secara manual. Untuk meminimalisasi kesalahan, hanya plate yang mengandung 10-100 plaque yang dihitung, tergantung pada ukuran plate sel kultur yang digunakan (Krisnawan, 2011).





### BAB III

#### KERANGKA KONSEPTUAL

##### Uraian Kerangka Konseptual

Pada tahun 2009 Influenza A merupakan ancaman pandemi utama dan berpotensi menginfeksi 30% dari populasi dunia dalam hitungan bulan. Bahkan angka kematian secara keseluruhan konservatif 2%, dapat menghasilkan sekitar 135.000.000 kematian di seluruh dunia (Gatherer, 2009). Virus influenza A sub tipe H1N1 telah menjadi wabah pandemik dari virus influenza strain baru yang diidentifikasi pada bulan April 2009, yang sering kita sebut penyakit flu babi (*swine flu*). Hanya dalam waktu empat bulan, wabah pandemik telah menyebabkan banyak kematian hampir di seluruh negara di dunia dan pertama kali dideteksi di negara Meksiko (Rahdiansyah, 2010). Diseluruh dunia sampai pada 4 Agustus 2009 sudah 168 negara yang melaporkan kasus influenza A H1N1 dengan 162.380 kasus positif, 1.154 diantaranya meninggal dunia (DepKes RI, 2009). Dan data jumlah kumulatif infeksi H1N1 di Indonesia sampai dengan 23 Agustus 2009 sebanyak 1.005 orang dengan 5 orang diantaranya meninggal dunia (Maryanto *et al.*, 2011).

Keragaman genetik tinggi virus influenza tipe A berkontribusi terhadap adaptasi tinggi dari virus dan kemampuannya untuk menghindari sistem kekebalan tubuh dengan dengan *antigenic drift* (mutasi) dan *antigenic shift* (rekombinasi virus influenza dari hemagglutinin) (Spackman,

2008). Keganasan virus influenza tergantung pada kemampuan precursor HA yang disintesis sebagai suatu polipeptida precursor single ( $HA_0$ ) dan terbelah menjadi  $HA_1$  dan  $HA_2$  oleh protease sel inang. Adanya hambatan pembelahan  $HA_0$  melalui hambatan terhadap protease merupakan salah satu cara mencegah replikasi virus selanjutnya (Serkedjieva *et al.*, 2006).

Vaksinasi adalah strategi intervensi kesehatan masyarakat yang paling efektif dan hal ini harus didukung untuk meningkatkan pengawasannya. Namun, pendekatan ini sulit dilakukan vaksin dan antivirus kimia sintetis mulai mengalami resistensi karena banyak muncul *strain* virus baru yang spesifik. Meskipun penggunaan obat antivirus merupakan hal umum dalam penanggulangan kesehatan, mencegah dan mengobati influenza merupakan hal yang penting karena munculnya strain yang resisten terhadap obat virus flu burung (Baz, *et al* 2013). Food and Drug Administration (FDA) Amerika Serikat telah merekomendasikan 4 (empat) jenis obat antiviral untuk pengobatan dan pencegahan influenza A. Jenis obat tersebut diantaranya adalah M2 inhibitors (amantadin dan rimantadin) dan neuraminidase inhibitors (oseltamivir dan zanamivir). Selain digunakan dalam pengobatan, oseltamivir juga dapat dimanfaatkan sebagai profilaksis atau pencegahan terhadap penyakit flu burung. (Depkes, RI 2007). Resistensi pada golongan inhibitor neuraminidase terjadi karena substitusi satu asam amino pada neuraminidase (NA), yaitu mutasi H274T (Mahardika, 2008). Sedangkan resistensi pada turunan *adamantane* terjadi karena adanya substitusi asam amino tunggal pada urutan 26 (Leu→Phe),

27 (Val→Ala atau Thr), 30 (Ala→Thr atau Val), 31 (Ser→Asn atau Arg) dan 34 (G→E) dalam domain trans membran M2 (Dharmayanti *et al.*, 2010).

Pendekatan alternatif lain adalah penggunaan spektrum luas dan antiinfluenza dari ekstrak herbal dan senyawa yang menunjukkan efektivitas dalam uji in vitro. Antivirus Herbal dapat memberikan hambatan lebih luas dari semua strain virus, baik berdasarkan inaktivasi virus langsung atau maupun menghambat satu atau lebih tahap-tahap penting replikasi virus. Ekstrak anti virus herbal selanjutnya dapat menunjukkan beberapa bioaktivitas, dan hal ini dapat memungkinkan penggunaannya pada dosis yang relatif rendah dari senyawa aktif, memungkinkan terjadinya efek sinergis, serta dapat menyediakan obat yang relatif aman dengan efek samping seminimal mungkin (Pleschka *et al.*, 2009).

Dalam pencarian obat antivirus baru untuk infeksi virus influenza, ekstrak dan produk yang berasal dari bahan alam menyediakan sumber alternatif sebagai bahan dengan cara aktivitas sebagai penghambatan virus influenza. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak kaya polifenol, yang didefinisikan sebagai polifenol kompleks, terisolasi dari tanaman obat *Geranium sanguineum L.* melindungi tikus dari kematian pada eksperimental influenza A (Serkedjieva, *et al* 2008). Pengikatan reseptor influenza virus dengan sel inang pada ekstrak fenol dari *C. sinensis* menghambat aktivitas hemaglutinasi dari influenza virus (Sawai, *et al* 2008). Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Temu Ireng (*Curcuma aeruginosa L.*)

asal Bogor dalam komposisi tunggal maupun kombinasi menunjukkan potensi yang baik secara *in vitro* dalam menghambat infeksi virus AI H5N1 ke sel vero sampai dengan hari ke-3 post infeksi (Setyono dan Bermawie, 2013).

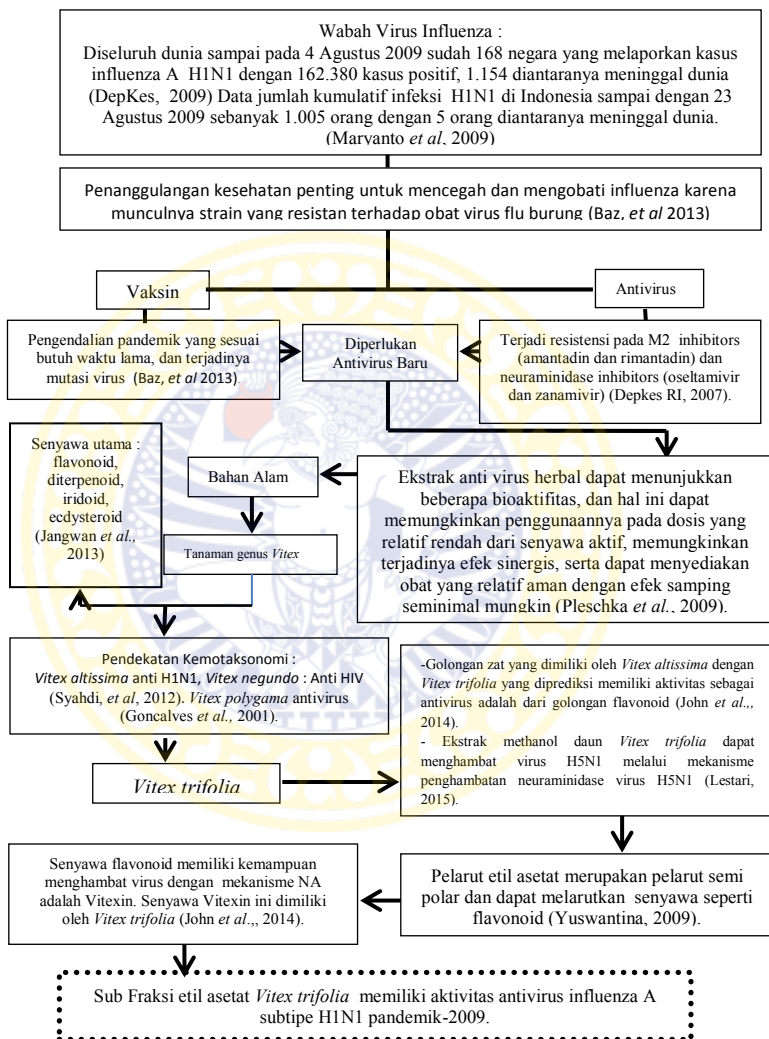
Pengobatan herbal, secara umum lebih aman daripada obat kimia konvensional dan memiliki kemungkinan lebih kecil untuk terjadi resistensi virus karena fungsi beragam yang dimiliki. Selain itu, sediaan herbal tertentu tidak hanya ditujukan untuk virus tetapi juga untuk mengatasi gejala influenza tersebut (Hudson, 2009). Di Indonesia, pemanfaatan tanaman sebagai obat alam sudah sangat meluas. Dasar penggunaan obat tradisional tersebut di masyarakat berdasarkan informasi empirik. Dari sekian banyak tanaman obat tradisional Indonesia, hanya beberapa saja yang sudah mempunyai data-data ilmiah. Salah satu tanaman yang mempunyai beberapa data-data ilmiah adalah tanaman legundi (*Vitex trifolia*) (Nugroho, 2005). Ekstrak air *Vitex trifolia* dari bagian atas tanaman dapat menghambat proses transkripsi HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (Matsui *et al*, 2009).. Pada penelitian sesama genus *Vitex*, yaitu ekstrak dan fraksi yang kaya flavonoid dari buah dan daun *Vitex polygama Cham* (Vebenaceae) dapat meningkatkan aktivitas antiviral *dose-dependent* terhadap virus herpes simplex tipe 1 (ACV-HSV-1). Ekstrak daun menunjukkan aktivitas antivirus intraseluler sementara ekstrak buahnya mempunyai efek virusidal. Suatu fraksi dari ekstrak etil asetat daun dapat menghambat propagasi virus dengan memblokir reseptor sel HEp-2 (Goncalves *et al.*, 2001).

. Senyawa yang paling dominan terkandung dalam genus vitex adalah golongan flavonoid, diterpenoid, iridoid, dan ecdysteroid (Jangwan *et al.*, 2013). Golongan zat yang dimiliki oleh *Vitex altissima* dengan *Vitex trifolia* yang diduga memiliki aktivitas sebagai antivirus adalah dari golongan flavonoid. Ekstrak daun *Vitex trifolia* dapat menurunkan titer virus H1N1 yang dilakukan dengan uji HA. Ekstrak methanol daun *Vitex trifolia* dapat menghambat virus H5N1 melalui mekanisme penghambatan neuraminidase virus H5N1 (Lestari, 2015). Pelarut etil asetat merupakan pelarut semi polar dan dapat melarutkan senyawa seperti flavonoid (Yuswantina, 2009). Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa ekstrak methanol yang mengandung senyawa flavonoid daun *Vitex trifolia L* memiliki kemampuan untuk menghambat virus dengan mekanisme NA. Salah satu senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan menghambat virus dengan mekanisme NA adalah Vitexin. Senyawa Vitexin ini dimiliki oleh *Vitex trifolia* (John *et al.*, 2014). Berdasarkan fakta-fakta tersebut diharapkan sub fraksi etil asetat dapat menjadi kandidat antivirus H1N1 pandemi 2009.

### **Hipotesis penelitian**

- 1.Sub Fraksi etil asetat *Vitex trifolia* memiliki aktivitas antivirus terhadap virus influenza A subtype H1N1 pandemik-2009.

### 3.1 Alur Kerangka Konseptual



**Gambar 3.1** Kerangka konseptual

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Variabel Penelitian

##### 4.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variable yang menjadi penyebab utama pokok permasalahan yang diteliti. Jika ada perubahan jenis atau perubahan besaran variabel bebas akan mengakibatkan perubahan pada variable tergantung (zainudin, 2014).

Variabel bebas: Sub Fraksi etil asetat daun *Vitex trivolia*

##### 4.1.2 Variabel Tergantung

Merupakan variabel yang menunjukkan akibat adanya variabel sebab dan variabel *intervening*. Jenis dan besarnya akan berubah tergantung pada perubahan jenis dan besaran variabel bebas (Zainudin, 2014).

Variabel terikat: persentase penghambatan antivirus.

##### 4.1.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang sepanjang penelitian berlangsung dibuat sedemikian rupa sehingga konstan atau dalam kondisi yang sama. Dalam penelitian pengendalian variabel dapat dilakukan antara lain dengan cara menyusun kriteria inklusi dan eksklusi untuk subjek penelitian, agar subjek penelitian homogen (Zainudin, 2014).

Variabel kontrol: virus influenza A sub tipe H1N1 pandemi-2009 telur ayam berembrio (TAB), sel darah merah (SDM) marmot (*Guinea pig*), *phospate buffer saline* (PBS).

## **4.2 Bahan**

### **4.2.1 Bahan Uji**

Bahan uji yang digunakan adalah Sub Fraksi Flavonoid daun *Vitex trifolia*. yang di isolasi dengan cara fraksinasi.

### **4.2.2 Virus dan Media Pengujian**

Virus influenza yang digunakan adalah virus influenza A sub tipe H1N1 pandemi-2009 *strain* A/Unair-367/2010 dan yang diambil dari Laboratorium *Avian Influenza Research Center* (AIRC) di Universitas Airlangga. Virus ditumbuhkan pada telur ayam berembrio (TAB) yang bersifat SAN (*Serum Antibody Negative*) yang diperoleh dari Pusvetma, Surabaya. Uji hemaglutinasi (HA) dilakukan menggunakan sel darah merah marmot.

### **4.2.3 Bahan Kimia**

Silica Gel GF<sub>254</sub>, silica gel 60G *for thin-layer chromatography*, Silica Gel 60, metanol teknis (Brataco), Etil Asetat (Brataco), n-heksana (Brataco), Kloroform Pa (Fulltime), Tablet *Phospate Buffer Saline* (PBS) (GIBCO), Dimetilsulfoksida (DMSO) (Merck), *Sterile Water For Irrigation U.S.P.* (Otsuka),



*red blood cell* (RBC) marmot, larutan antibiotik Penisilin-Streptomisin (Gibco).

### **4.3 Alat**

Kromatografi kolom vakum, kertas saring, corong pisah, UV scanner (CAMAAG), Timbangan analitik (Ohaus), Chamber, otoklaf (HL-340), *Biosafety cabinet* (NuAire), incubator, mikropipet (Eppendorf), alat-alat gelas, *96-well plate* "U" dan "V" (Coastar), Sentrifus (Tommy), *refrigerator* 4°C (Sanyo), *freezer* -80°C, Vortex (Barstead Thermolyne), spuit injeksi 1 mL, corong Buchner (Schott), *rotary evaporator* (Buchi).

## **4.4. Prosedur Kerja**

### **4.4.1. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun *Vitex trifolia* L.**

Ekstrak kental methanol daun *Vitex trifolia* ditimbang kemudian ditambahkan air sama banyak masukkan dalam corong pisah. Siapkan n-heksana dengan volume sama banyak dan masukkan dalam corong pisah, kocok sampai homogen setelah itu dipisahkan antara fraksi air dan n-heksana. Tampung fraksi n-heksana. Proses ini diulang sampai fraksi n-heksana tidak berwarna gelap. Pada proses ini di dapatkan tampungan fraksi n-heksana. Pada fraksi air yang masih berada pada corong pisah di tambahkan etil asetat sama banyak, kemudian dikocok sampai homogen, dan fraksi etil asetat di tampung. Langkah ini diulangi sampai pada fraksi etil asetat tidak berwarna. Kemudian didapatkan tampungan fraksi etil asetat, fraksi etil asetat di uapkan

pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40° C hingga didapatkan fraksi etil asetat kental.

#### **4.4.2. Prosedur Kromatografi Kolom Vakum Pembuatan Sub Fraksi Flavonoid Daun *Vitex trifolia*.**

Ditimbang sebanyak 32 gram silica gel 60G *for thin-layer chromatography* menggunakan cawan porselen. Diratakan pada kolom cepat dengan cara ditekan pelan-pelan hingga ketinggian silica  $\frac{3}{4}$  dari tinggi kolom sambil dinyalakan vakum. Dimasukkan kloroform sebanyak 100 ml dan dinyalakan vakum. Ditampung tetesan kloroform sampai habis. Ditimbang fraksi etil asetat daun *vitex trifolia* 3.2 gram. Silica gel ditimbang sama banyak dengan fraksi etil asetat, fraksi dan silica kristal dicampur dengan tujuan agar tersalutkan. Ditambah silica gel satu lapis diatas fraksi dimasukkan dalam kolom vakum dan dinyalakan.

- Ditambahkan kloroform 100 ml, dinyalakan vakum dan ditampung tetesan kloroform sampai habis
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (9:1 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (8:2 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (7:3 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)

- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (6:4 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (5:5 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (4:6 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (3:7 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (2:8 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (1:9 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan etil asetat 100 ml dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah).

Kemudian dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator*. Setelah itu optimasi eluen dengan uji KLT untuk mengetahui komposisi eluen yang dapat memberikan pemisahan yang baik. Sub fraksi Flavonoid yang menunjukkan spot atau noda flavonoid terbanyak akan diambil untuk diuji.

#### 4.4.3. Pembuatan Phosphate Buffer Saline (PBS)

Setiap 2 tablet dilarutkan dalam 1 L *water for irrigation* (WFI) dalam botol kaca dan akan diperoleh cairan PBS 0,01 M dengan pH 7,2. Selanjutnya ditutup, jangan terlalu rapat karena akan disterilkan, dilapisi aluminium foil dan kemudian disterilisasi dengan otoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C. Tahap selanjutnya larutan disimpan dalam pendingin dengan suhu 4° C.

#### 4.4.4. Pengenceran Larutan Induk Sub Fraksi A dan B Daun *Vitex Trifolia*

Pembuatan larutan induk sub fraksi dengan melarutkan 50,0 mg masing-masing sub fraksi dalam 2,00 mL PBS dan 0,5 mL DMSO. Campuran tersebut divorteks hingga larut. Larutan tersebut ditambahkan dengan PBS dalam labu ukur hingga volume 10,00 mL dan didapatkan larutan induk 5000 ppm. Selanjutnya dilakukan pengenceran berseri dengan memipet larutan induk sebanyak 8,00 mL diencerkan dengan 2,00 mL PBS dan seterusnya hingga 5 kali pengenceran. Konsentrasi larutan sub fraksi A dan B yang dipakai untuk uji dari pengenceran berseri ini adalah 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan 125 ppm.

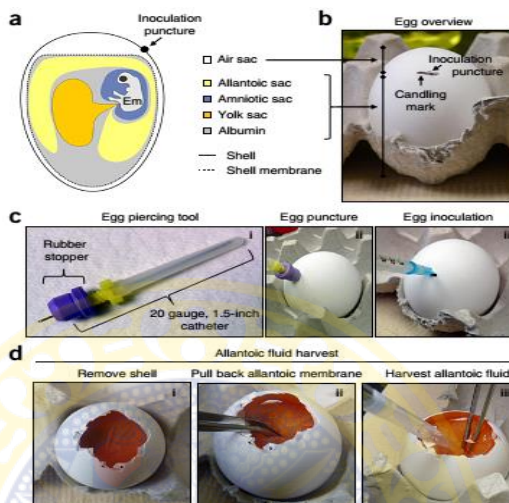


**Gambar 4.1** Pengenceran berseri

#### 4.4.5. Menentukan Dosis Aman dari Sub Fraksi A dan B Daun *Vitex trifolia*

Uji toksisitas dan penentuan konsentrasi sub fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* menggunakan Telur Ayam Berembrio (TAB) yang berusia 11 hari. Disiapkan 15 TAB yang sudah berumur 11 hari kemudian di desinfeksi bagian luar telur dengan menggunakan alkohol 70%. Selanjutnya dicandling untuk melihat apakah embrio di dalam telur tersebut ada yang mati atau tidak dengan melihat pergerakan embrio dan pembuluh darahnya. Kemudian dengan bantuan *egg candler*, TAB diberi tanda batas dengan pensil antara rongga hawa dan isi telur. Pembuatan tanda „x’ pada telur pembuatan lubang tidak boleh terlalu dekat dengan embrio dan tempat yang banyak pembuluh darah, karena jika terkena embrio atau pembuluh darah, telur mati. Jarak pembuatan lubang kurang lebih 3-5 mm dari batas ruang hawa. TAB yang sudah diberi tanda “x” dilubangi dengan alat pelubang steril di dalam *biosafety cabinet*.

Lima konsentrasi sub fraksi yang telah dibuat 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm dan 125 ppm tiap konsentrasi diambil sebanyak 100 $\mu$ L + 50 $\mu$ L larutan pen strep. Tiap konsentrasi kemudian diinokulasikan ke dalam TAB, masing-masing konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Setelah memasukan sub fraksi + larutan pen strep, lubang yang ada pada telur ditutup dengan selotip hingga benar-benar rapat. TAB di inkubasikan pada inkubator 37 $^{\circ}$ C selama 2 hari. Setiap hari telur diamati untuk *dicandling* embrionya. Embrio yang mati sebelum dua hari, dikeluarkan dari inkubator kemudian disimpan di lemari pendingin dengan suhu 4 $^{\circ}$ C. Setelah 2 hari TAB yang tidak mati dipindahkan ke lemari pendingin dengan suhu 4 $^{\circ}$ C selama semalam (WHO, 2011). Dari proses tersebut bisa ditentukan konsentrasi mana yang akan digunakan untuk uji aktivitas. Virus yang akan digunakan untuk uji aktivitas memiliki titer 2<sup>12</sup>.



**Gambar 4.2** Inokulasi Telur Ayam Berembrio dan pemanenan cairan allantois. (A) Anatomi telur ayam berembrio. (B) Telur ayam berembrio umur 10 hari, tempat untuk memberi tanda saat inokulasi. (C) Spuit untuk menginjeksi bahan uji dan cara menginokulasi (D) Prosedur cara pemanenan cairan alantois (Eisfeld *et al.*, 2014).

Dalam penelitian ini dilakukan 2 kelompok perlakuan, yaitu:

#### 1. Kelompok Kontrol

- a. Menginjeksikan 100  $\mu\text{L}$  virus influenza A subtype H1N1 pandemi-2009 + 100  $\mu\text{L}$  Zanamivir 15  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{L}$  larutan Penisilin-Streptomisin (10.000U/mL) (kontrol positif; menggunakan 3 TAB)
- b. Menginjeksikan 100  $\mu\text{L}$  virus influenza A subtype H1N1 pandemi-2009 + 50  $\mu\text{L}$  larutan Penisilin-

Streptomisin (10.000U/mL) (kontrol negatif;  
menggunakan 3 TAB)

## 2. Kelompok Perlakuan

Menginjeksikan 100  $\mu$ L virus influenza A sub tipe H1N1 pandemi-2009 + 100  $\mu$ L sub fraksi larutan Daun *Vitex trifolia L.* pada konsentrasi tidak toksik + 50  $\mu$ L larutan Penisilin-Streptomisin (10.000U/mL) (masing-masing konsentrasi menggunakan 3 TAB, larutan sub fraksi uji dicampur dengan virus diinjeksikan kemudian di injeksikan dalam TAB)

TAB yang sudah diberi perlakuan ditutup dengan selotip plastik. TAB disimpan dalam inkubator dengan suhu 37° C selama 3x24 jam. Setiap 1x24 jam TAB diamati embrionya menggunakan *egg candler*. Untuk embrio yang mati sebelum hari ketiga, dipisahkan kemudian disimpan dalam lemari pendingin 4° C selama semalam dan dipanen cairan *allantois*-nya pada keesokan harinya. Untuk embrio yang masih bertahan hingga hari ketiga, akan dimatikan dengan cara memindahkannya kedalam lemari pendingin 4° C selama semalam dan dipanen cairan *allantois*-nya. Cairan *allantois* yang telah dipanen kemudian disentrifus 3000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifus, akan terbentuk dua bagian, yaitu bagian supernatan (cairan jernih) dan pelet (endapan). Selanjutnya supernatan diambil menggunakan mikropipet dan dilakukan uji HA (WHO, 2011).



#### 4.4.6. Pembuatan Sel Darah Merah Marmot 0,75%

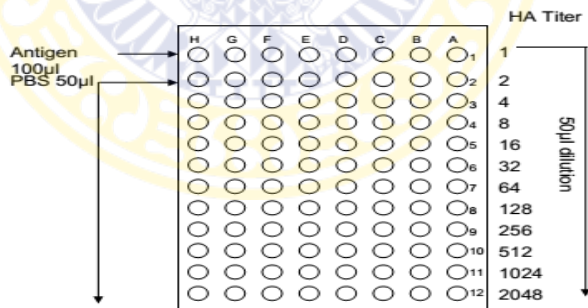
Sel darah merah (SDM) yang digunakan untuk uji hemaglutinasi dibuat dengan mengambil masing-masing 3-5 mL sel darah merah marmot dengan menggunakan spuit injeksi. SDM dipindahkan ke dalam tabung yang telah diberi antikoagulan. Selanjutnya SDM dimasukkan ke dalam *conical* 15 mL dan ditambahkan PBS hingga  $\frac{3}{4}$  volume total *conical*. Campuran SDM dan PBS disentrifus 3000 rpm selama 15 menit. Setelah disentrifus maka akan terbentuk dua fase yaitu cairan bening di bagian atas dan endapan merah di bagian bawah. Kemudian cairan pada bagian atas tersebut dipipet dan dibuang. Langkah penambahan PBS hingga pembuangan cairan hasil sentrifus diatas adalah proses pencucian sel darah merah. Pencucian SDM diulangi hingga didapatkan cairan hasil sentrifus yang bening dan tidak berwarna. Selanjutnya, endapan merah di bagian bawah yang merupakan SDM dipipet sesuai perhitungan dengan rumus:

$$\text{Sel Darah Merah marmot} = \frac{0,75}{100} \times \text{Volume akhir suspensi SDM}$$

SDM yang sudah dipipet ditambahkan dengan PBS hingga volume akhir yang diinginkan dan dihomogenkan dengan cara dibolak-balik secara perlahan untuk menghindari hemolisis.

#### 4.4.7. Uji Hemaaglutinasi

Untuk uji HA menggunakan sel darah merah marmot 0,75%, digunakan *plate* “U” (WHO, 2011) (Eisfeld *et al.*, 2014). Pertama, perlu disiapkan 50  $\mu$ l PBS dalam semua sumuran, kemudian ditambahkan 50 $\mu$ l cairan *allantois* yang akan diuji kedalam sumuran A (1-12, 1 sampel/sumuran) dan setelah itu dilakukan pengenceran berseri dengan mengambil 50  $\mu$ l dari sumuran A ke B dan seterusnya hingga sumuran H, yang terakhir dibuang. Selanjutnya setiap sumuran diberi 50  $\mu$ l sel darah merah marmot 0,75%, digoyang-goyang agar homogen, ditutup, dan diinkubasi pada lemari pendingin 4°C selama 60 menit. Nilai titer HA adalah pengenceran tertinggi dari virus yang masih memperlihatkan hemaglutinasi sempurna. Titer HA adalah kebalikan dari pengenceran virus (WHO, 2011).

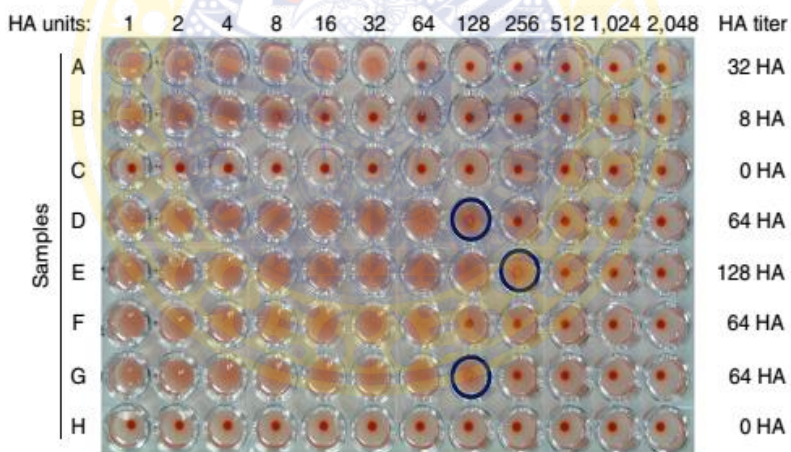


**Gambar 4.3** *Well Plate-96* (WHO, 2011)

#### 4.4.8. Analisis Data

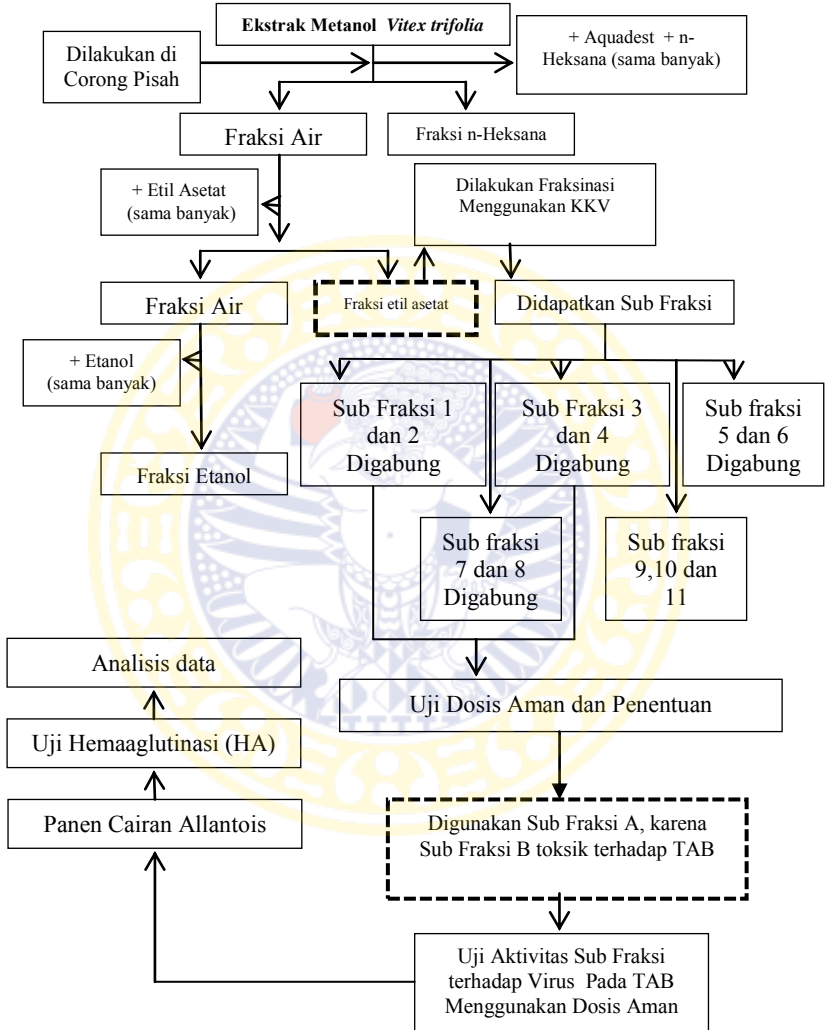
Untuk uji HA yang dilakukan adalah membandingkan titer HA sampel dengan kontrol. Dibuat persentase penurunan titer HA, hal ini akan menunjukkan kemampuan sampel uji dalam menghambat virus. Menurut Untari *et al.* (2012), Persentase penghambatan antiviral dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Persentase penghambatan antiviral} = \frac{\text{Titer HA tanpa perlakuan} - \text{Titer HA perlakuan}}{\text{Titer HA tanpa perlakuan}} \times 100\%$$



**Gambar 4.4** Interpretasi Hasil Titration Uji HA Dalam 96 Well Plate (Eisfeld *et al.*, 2014)

**Kerangka Operasioanal**



**Gambar 4.5** Kerangka operasional

## BAB V HASIL PENELITIAN

### 5.1. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Daun *Vitex trifolia* Menggunakan Corong Pisah.

Keterangan	Jumlah
Ekstrak metanol daun <i>Vitex trifolia</i>	143 gram
Pelarut yang digunakan :	
Aquadest	286 mL
n-heksana	2000 mL
Etil Asetat	2000 mL
Hasil Fraksi yang telah diuapkan pelarutnya dengan <i>Rotary Evaporator</i>	
Fraksi n-Heksana	30 gram
Fraksi Etil asetat	37 gram

**Tabel 5.1** Pembuatan Fraksi Etil Asetat  
Daun *Vitex trifolia*

### 5.2. Pembuatan Sub Fraksi Flavonoid Menggunakan Kromatografi Kolom Vakum.

Pembuatan Sub Fraksi Flavonoid diawali dengan penimbangan 32 gram silica gel 60 G *for thin-layer chromatography* menggunakan cawan porselen. Diratakan pada kolom cepat dengan cara ditekan pelan-pelan hingga ketinggian silica  $\frac{3}{4}$  dari tinggi kolom sambil dinyalakan vakum. Dimasukkan

kloroform sebanyak 100 ml dan dinyalakan vakum. Ditampung tetesan kloroform sampai habis. Ditimbang fraksi etil asetat daun *vitex trifolia* 3.2 gram. Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) *for column chromatography* ditimbang sama banyak dengan fraksi etil asetat, fraksi dan silica gel 60 dicampur dengan tujuan agar tersalutkan. Ditambah silica gel satu lapis diatas fraksi dimasukkan dalam kolom vakum dan dinyalakan.

- Ditambahkan kloroform 100 ml, dinyalakan vakum dan ditampung tetesan kloroform sampai habis
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (9:1 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (8:2 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (7:3 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (6:4 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (5:5 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)

- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (4:6 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (3:7 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (2:8 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan Kloroform : etil asetat (1:9 v/v) sebanyak 100 mL dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)
- Ditambahkan etil asetat 100 ml dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah).

Kemudian dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* pada masing-masing sub fraksi tersebut.

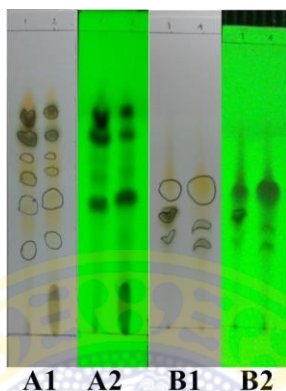
Kode Sub Fraksi	Perbandingan
1	Kloroform 100 ml
2	Kloroform : Etil Asetat (9:1 V/V) sebanyak 100mL
3	Kloroform : Etil Asetat (8:2 V/V) sebanyak 100mL
4	Kloroform : Etil Asetat (7:3 V/V) sebanyak 100mL
5	Kloroform : Etil Asetat (6:4 V/V) sebanyak 100mL
6	Kloroform : Etil Asetat (5:5 V/V) sebanyak 100mL
7	Kloroform : Etil Asetat (4:6 V/V) sebanyak 100mL
8	Kloroform : Etil Asetat (3:7 V/V) sebanyak 100mL
9	Kloroform : Etil Asetat (2:8 V/V) sebanyak 100mL
10	Kloroform : Etil Asetat (1:9 V/V) sebanyak 100mL
11	Etil Asetat 100 mL

**Tabel 5.2** Kode Sub Fraksi dan Perbandingannya

### **5.3. Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis.**

Pemisahan senyawa flavonoid sub fraksi 1 sampai dengan 11 dilakukan untuk mendapatkan pemisahan noda yang baik (eluen terbaik) dengan eluen kloroform : etil asetat, dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Uji flavonoid digunakan penampak noda uap amonia apabila setelah diberi uap amonia terjadi warna kuning maka dapat disimpulkan sub fraksi tersebut mengandung flavonoid (Rhamadhani *et al.*, 2013). Sub fraksi hasil Kromatografi kolom vakum yang telah di uji KLT, dikumpulkan pola noda yang sama digabung menjadi sub fraksi besar. Setelah didapatkan sub fraksi yang terpilih kemudian diujikan pada TAB.





**Gambar 5.1** Pemisahan Sub Fraksi 1,2,3 dan 4.

**Keterangan Gambar 5.1 :**

**A. Pemisahan Sub Fraksi 1 dan 2 menggunakan eluen Kloroform : Etil Asetat (9:1v/v)**

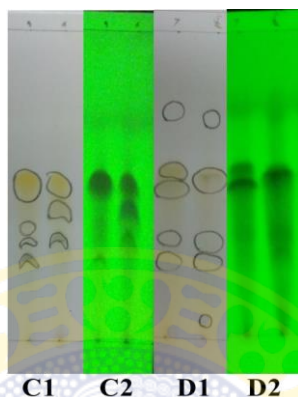
A1. Gambar Sub fraksi 1 dan 2 dengan Penampak Noda Amonia

A2. Gambar Sub fraksi 1 dan 2 dengan Sinar UV 254nm

**B. Pemisahan Sub Fraksi 3 dan 4 menggunakan eluen Kloroform : Etil Asetat (1:9v/v)**

B1. Gambar Sub fraksi 3 dan 4 dengan Penampak Noda Amonia

B2. Gambar Sub fraksi 3 dan 4 dengan Sinar UV 254nm



**Gambar 5.2** Pemisahan Sub Fraksi 5,6,7 dan 8

**Keterangan Gambar 5.2 :**

**C. Pemisahan Sub Fraksi 5 dan 6 menggunakan eluen Kloroform : Etil Asetat (1:9v/v)**

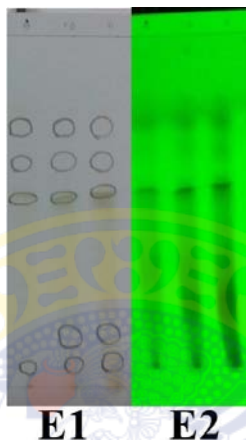
C1. Gambar Sub fraksi 5 dan 6 dengan Penampak Noda Amonia

C2. Gambar Sub fraksi 5 dan 6 dengan Sinar UV254nm

**D. Pemisahan Sub Fraksi 7 dan 8 menggunakan eluen Kloroform : Etil Asetat (1:9v/v)**

D1. Gambar Sub fraksi 7 dan 8 dengan Penampak Noda Amonia

D2. Gambar Sub fraksi 7 dan 8 dengan Sinar UV 254nm



**Gambar 5.3** Pemisahan Sub Fraksi 9, 10 dan 11

**Keterangan Gambar 5.3 :**

**E. Pemisahan Sub Fraksi 9, 10 dan 11 menggunakan eluen Kloroform : Etil Asetat (1:9v/v)**

E1. Gambar Sub fraksi 9, 10 dan 11 dengan Penampak Noda Amonia

E2. Gambar Sub fraksi 9, 10 dan 11 dengan Sinar UV 254nm

Sub Fraksi yang digunakan untuk uji dosis aman adalah gabungan sub fraksi 1 dan 2 dan sub fraksi gabungan 3 dan 4 karena mempunyai noda flavonoid yang lebih intensif dari sub fraksi yang lainnya, yang selanjutnya disebut Sub Fraksi A untuk Sub fraksi gabungan 1 dan 2, Sub Fraksi B untuk Gabungan Sub Fraksi 3 dan 4.

#### **5.4. Hasil Uji Dosis Aman Sub fraksi A dan B daun *Vitex trifolia* pada TAB**

Uji dosis aman dilakukan pada Telur Ayam Berembrio (TAB) karena uji aktivitas yang akan dilakukan menggunakan media TAB. Untuk mengetahui sub fraksi tidak menimbulkan toksisitas terhadap TAB, maka dilakukan uji dosis aman pada TAB. TAB yang digunakan berumur 10-11 hari dengan menginokulasikan sub fraksi terpilih daun *Vitex trifolia* dalam PBS dan DMSO 5% yang dibuat terlebih dahulu dalam baku induk 5000 ppm dan dilakukan pengenceran berseri dari konsentrasi 4000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan 125 ppm, dengan konsentrasi fraksi yang di pakai untuk uji yaitu 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm; 2000 ppm masing-masing konsentrasi diinjeksikan sejumlah 100  $\mu$ L. TAB yang sudah diberi perlakuan kemudian di inkubasi selama 72 jam dan dilakukan pengamatan setiap 24 jam.

Perlakuan Larutan Uji Sub Fraksi A	Waktu Inkubasi								
	24 jam			48 jam			72 jam		
	TAB ke-			TAB ke-			TAB ke-		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
125 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	-
500 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1000 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2000 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabel 5.3** Hasil uji dosis aman larutan sub fraksi A daun *Vitex trifolia* pada TAB.

Perlakuan Larutan Uji Sub Fraksi B	Waktu Inkubasi								
	24 jam			48 jam			72 jam		
	TAB ke-			TAB ke-			TAB ke-		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
125 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	-
500 ppm	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1000 ppm	+	+	+	+	+	+	-	+	-
2000 ppm	+	+	+	+	+	+	-	+	+

**Tabel 5.4** Hasil uji dosis aman larutan fraksi B daun *Vitex trifolia* pada TAB

Keterangan:

- ( + ) : TAB Hidup  
( - ) : TAB Mati

Tanda (+) pada tabel menunjukkan bahwa embrio pada TAB tetap hidup. TAB diamati setiap 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Setelah 72 jam inkubasi, embrio pada larutan uji sub fraksi A terjadi kematian (-) pada replikasi 3 pada 500 ppm dan pada replikasi 3 pada 1000 ppm, sedangkan pada larutan uji sub fraksi B terjadi kematian pada replikasi 250 pm pada replikasi ke 3, 500 ppm pada replikasi ke 1, 1000 ppm pada replikasi ke 1 dan ke 3 serta pada 2000 ppm pada replikasi ke 1. Karena pada sub fraksi B terjadi banyak kematian pada TAB maka pada sub fraksi ini tidak digunakan dalam penelitian karena bersifat toksik.

### **5.5. Hasil Uji Aktivitas Sub Fraksi A daun *Vitex trifolia* Pada Telur Ayam Berembrio (TAB) Terhadap Virus Influenza A Subtipe H1N1 Pandemi 2009.**

#### **a. Hasil Pengamatan terhadap Kematian TAB**

Uji aktivitas virus influenza A subtipe H1N1 Pandemi 2009 dilakukan pada 15 Telur Ayam Berembrio (TAB). Telur Ayam Berembrio yang digunakan bersifat SAN artinya tidak terdapat antibodi dalam telur tersebut, maka saat ada virus yang masuk tidak ada antibodi yang dapat melawan virus tersebut, sehingga akan meminimalisasi timbulnya hasil positif palsu pada penelitian ini. Terdapat 5 perlakuan yang dilakukan pada 15 TAB tersebut, masing-masing perlakuan dengan diinjeksikan pada 3 TAB. Titer virus awal yang digunakan adalah  $2^{12}$  jumlah virus yang di injeksikan 100  $\mu$ L. Hasil pengamatan kematian TAB dapat dilihat dalam tabel dibawah ini.

Perlakuan	Waktu Inkubasi								
	24 jam			48 jam			72 jam		
	TAB ke-			TAB ke-			TAB ke-		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	-	+	+	-	-	-

**Tabel 5.5** Pengamatan pada TAB setelah diinjeksi virus influenza A sub tipe H1N1 Pandemi 2009

**Keterangan:**

(+) : TAB hidup

(-) : TAB mati

Perlakuan 1 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 125 ppm 100 $\mu$ L

Perlakuan 2 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 250 ppm 100 $\mu$ L

Perlakuan 3 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 500 ppm 100 $\mu$ L

Perlakuan 4 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 1000 ppm 100 $\mu$ L

Perlakuan 5 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 2000 ppm 100 $\mu$ L

Perlakuan 6 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L (Kontrol Negatif)

Perlakuan 7 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Zanamivir 15 $\mu$ M (Kontrol Positif)

Telur Ayam Berembrio (TAB) yang telah diberi perlakuan diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C. Tanda (+) menunjukkan bahwa TAB tetap hidup dan tanda (-) menunjukkan bahwa TAB mati. Dari kelima perlakuan, tidak ada TAB yang bertahan hidup hingga 72 jam. TAB perlakuan 5 dan 7 replikasi 1 mati pada 24 jam sedangkan, TAB Perlakuan ke 7 replikasi ke 2 dan 3 hidup pada jam ke 48 dan mati pada 72 jam. Selanjutnya dilakukan panen cairan *allantois* pada semua TAB dan dilakukan uji hemaglutinasi (HA).

#### **5.6. Hasil Uji Hemaglutinasi (HA) pada Virus Influenza A Subtipe H1N1 Pandemi 2009.**

Hasil uji HA dengan *Red Blood Cells* (RBC) Marmot 0,75%, pada uji aktivitas Sub Fraksi A daun *Vitex trifolia* Pada Telur Ayam Berembrio (TAB) terhadap virus influenza A Subtipe H1N1 Pandemi 2009 dapat dilihat dalam tabel berikut.



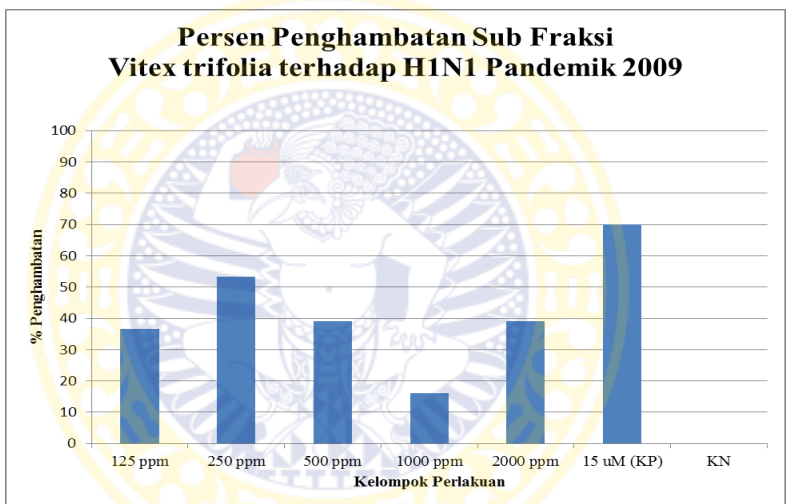
Perlakuan	Titer HA (HAU)			Rerata Titer HA (HAU)	Rerata Titer HA	% Pengham- batan
	TAB ke-				( <sup>2</sup> Log <sub>2</sub> )	
	1	2	3			
1	2 <sup>7</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7.66</sup>	7.66	36.66
2	2 <sup>7</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5.66</sup>	5.66	53.33
3	2 <sup>6</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7.33</sup>	7.33	39.16
4	2 <sup>10</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>10</sup>	2 <sup>10</sup>	10	16.66
5	2 <sup>8</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>7.33</sup>	7.33	39.16
6	2 <sup>12</sup>	2 <sup>12</sup>	2 <sup>12</sup>	2 <sup>12</sup>	12	0
7	2 <sup>0</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>0</sup>	2 <sup>2.66</sup>	2.66	70

**Tabel 5.6** Hasil uji HA pada uji aktivitas terhadap virus influenza A sub tipe H1N1 Pandemi 2009.

Keterangan:

- Perlakuan 1 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 125 ppm 100 $\mu$ L
- Perlakuan 2 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 250 ppm 100 $\mu$ L
- Perlakuan 3 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 500 ppm 100 $\mu$ L
- Perlakuan 4 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 1000 ppm 100 $\mu$ L
- Perlakuan 5 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Sub Fraksi 2000 ppm 100 $\mu$ L
- Perlakuan 6 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L (Kontrol Negatif)
- Perlakuan 7 : virus H1N1 100  $\mu$ L + Penstrep 50 $\mu$ L + Zanamivir 15 $\mu$ M (Kontrol Positif)

Dapat dilihat pada TAB ke-1 perlakuan ke 2 nilai titer HA adalah  $2^{10}$ , angka 10 menunjukkan bahwa pada pengenceran ke-10 masih terjadi hemaglutinasi sel darah merah oleh virus, dan angka 2 adalah faktor pengenceran pada uji HA. Pembacaan ini juga berlaku untuk hasil titer HA pada perlakuan dan TAB yang lain.



**Gambar 5.4** Grafik Presentase Penghambatan Sub Fraksi A daun gundi terhadap virus H1N1 Pandemi 2009.

## BAB VI PEMBAHASAN

Virus influenza digolongkan menjadi 3 tipe, yaitu virus influenza A, B dan C. Salah satu tipe yang menimbulkan pandemik adalah virus influenza A karena mudahnya mereka bermutasi, baik berupa *antigenic drift* ataupun *antigenic shift* sehingga membentuk varian-varian baru yang lebih patogen. Virus influenza H1N1 merupakan salah satu virus influenza A yang menimbulkan pandemik di dunia pada tahun 2009. Dari data WHO menyebutkan bahwa banyak terjadi kasus kematian yang tersebar di semua benua, sehingga WHO menaikkan status kewaspadaan pandemik influenza baru A H1N1 dari fase 5 ke fase 6 yang merupakan fase tertinggi (Depkes, 2010).

Pengobatan dan pencegahan influenza dapat dilakukan melalui pemberian antivirus dan vaksinasi. Saat ini terdapat 2 golongan obat antivirus influenza, yaitu golongan *adamantane* dan inhibitor neuraminidase. Namun pengendalian infeksi virus influenza A menggunakan antivirus mulai mengalami kendala karena munculnya *strain* baru yang resisten terhadap antivirus yang sudah ada (Purwitasari *et al.*, 2015). Pengobatan herbal, secara umum lebih aman daripada obat kimia konvensional dan memiliki kemungkinan lebih kecil untuk terjadi resistensi virus karena fungsi beragam yang dimiliki. Selain itu, sediaan herbal

tertentu tidak hanya ditujukan untuk virus tetapi juga untuk mengatasi gejala influenza tersebut (Hudson, 2009).

Sejarah penemuan obat antivirus oseltamivir berasal dari tanaman *Illicium verum* yang mengandung *shikimic acid*, *shikimic acid* merupakan bahan utama yang digunakan untuk membuat obat antivirus (Wang *et al.*, 2011). Luteolin dan vitexin dari tanaman *Aspalanthus linearis* serta apigenin-7-o-glukosidase dari *Melissa officinalis* memiliki aktifitas penghambatan terhadap rotavirus. Dua senyawa tersebut (luteolin dan vitexin) juga ditemukan pada *Vitex trifolia*. Golongan zat yang dimiliki oleh *Vitex altissima* dengan *Vitex trifolia* yang diduga memiliki aktivitas sebagai antivirus adalah dari golongan flavonoid (John *et al.*, 2014).

Penelitian ini menggunakan sub fraksi flavonoid daun legundi (*Vitex trifolia*) dengan pendekatan kemotaksonomi untuk mengetahui pengaruhnya terhadap virus flu babi (H1N1 Pandemi 2009). Pada penelitian sebelumnya telah terbukti bahwa ekstrak metanol daun *Vitex trifolia* dapat menurunkan titer virus H1N1 yang dilakukan dengan uji hemaaglutinasi (HA) dan secara Insilico melalui *software Molegro Virtual Docker* (MVD) berdasarkan hasil *docking* dapat diketahui jika vitexin dibandingkan dengan zanamivir sama-sama memiliki ikatan hidrogen pada Arginin 152 (*Arg 152*), Arginin 292 (*Arg 292*), Arginin 371 (*Arg 371*), Asam Aspartat *Asp 151*, Tirosin 406 (*Tyr 406*). Berdasarkan *rerank score*, vitexin memiliki *score* -95,6056 kcal/mol dan zanamivir -111,423 kcal/mol. Semakin rendah (negatif) nilai *rerank score*, maka dapat dikatakan bahwa ikatan

reseptor-ligan semakin stabil (Hayati, 2015). Penelitian sebelumnya juga terbukti bahwa ekstrak metanol daun *Vitex trifolia* dapat menurunkan titer virus H5N1 yang dilakukan dengan Uji Hemaaglutinasi (HA) dan Neuraminidase Inhibitor (NAI) (Lestari, 2015).

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu dengan proses fraksinasi ekstrak metanol daun legundi yang didapatkan dari penelitian sebelumnya. Fraksinasi ekstrak metanol menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksana dan etil asetat. Fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana bertujuan untuk menarik senyawa senyawa non polar (Chasani *et al*, 2013). Sedangkan etil asetat bertujuan untuk menarik senyawa senyawa semi polar dan dapat melarutkan senyawa seperti flavonoid (Yuswantina, 2009). Dasar pemilihan pelarut etil asetat karena pada fraksi etil asetat mempunyai warna kuning lebih intensif dari pada memakai pelarut etanol 95%, pada saat pengujian flavonoid dengan menggunakan penampak noda uap amonia (dapat dilihat pada lampiran 10). Fraksi etil asetat ditampung, kemudian pelarut etil asetat diuapkan dengan *Rotary Evaporator* hingga etil asetat yang ada pada fraksi menguap seluruhnya dan diperoleh fraksi kental. Kemudian fraksi etil asetat dilakukan pemisahan senyawa menggunakan metode Kromatografi Kolom Vakum (KKV). Prinsip kerja dari kromatografi kolom vakum adalah adsorpsi atau serapan, sedangkan pemisahannya didasarkan pada senyawa-senyawa yang akan dipisahkan terdistribusi di antara fasa diam dan fasa gerak dalam perbandingan yang berbeda-beda. Dimana

mekanisme adsorpsinya yaitu mengadsorpsi ion-ion dan molekul-molekul senyawa pada fase diam dan pemisahannya berdasarkan kelarutan senyawa dengan eluen yang digunakan. Keuntungan kromatografi kolom vakum yaitu mempunyai biaya ekonomis, adanya aliran fase gerak lebih cepat dan pengerjaannya sederhana.

Tahap selanjutnya dilakukan Pemisahan senyawa flavonoid masing-masing sub fraksi untuk mendapatkan pemisahan noda yang baik (eluen terbaik) dengan eluen kloroform : etil asetat, dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Uji flavonoid digunakan penampak noda uap amonia apabila setelah diberi uap amonia terjadi warna kuning maka dapat disimpulkan sub fraksi tersebut mengandung flavonoid (Rhamadhani *et al.*, 2013). Sub Fraksi yang digunakan untuk uji dosis aman adalah gabungan sub fraksi 1 dan 2 dan sub fraksi gabungan 3 dan 4, yang selanjutnya disebut sub faksi A dan sub fraksi B. Dasar pemilihan sub fraksi A dan B karena noda flavonoidnya lebih intensif dibanding sub fraksi lainnya. Untuk membuat larutan uji, sub faksi A dan sub fraksi B dilarutkan dalam DMSO 5% untuk membantu proses pelarutan fraksi dan *Phospat Buffer Saline* (PBS).

Untuk mengetahui pengaruh sub fraksi terhadap telur ayam berembrio (TAB) sebagai media pertumbuhan virus, maka dilakukan uji dosis aman sub faksi A dan sub fraksi B daun legundi pada TAB dalam beberapa konsentrasi fraksi yaitu, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm. Tidak ada batasan

dalam pemilihan konsentrasi tersebut selama dosis aman pada TAB (Murtini *et al.*, 2006) (Tare *et al.*, 2015). Telur ayam berembrio (TAB) yang digunakan bersifat SAN (*Serum Antibody Negative*), supaya tidak ada antibodi untuk melawan virus yang akan diinokulasikan (Purwitasari *et al.*, 2015). Telur yang digunakan dalam penelitian ini berusia 11 sampai 13 hari, karena TAB yang berumur 11 hari cairan alantois mencapai jumlah maksimal dan embrio nampak seperti anak ayam. Jika kurang dari 11 hari organ tubuh dan cairan alantois belum terbentuk sempurna, sedangkan bila lebih dari 13 hari maka cairan alantois akan menyusut (Tare *et al.*, 2015).

Inokulasi melalui rute cairan alantois merupakan rute yang paling aman karena tidak menyebabkan kematian embrio. Cairan alantois merupakan bagian dari cairan albumin yang sebagian besar terdiri dari air. Senyawa yang terlarut dalam cairan alantois akan berdifusi masuk ke dalam cairan amnion. Selanjutnya senyawa tersebut diserap secara perlahan ke dalam tubuh embrio melalui mulut dan trakhea sehingga tidak terjadi penumpukan senyawa dalam embrio (Murtini *et al.*, 2006). Setelah di inokulasi 72 jam, ditemukan adanya kematian pada sub fraksi A yaitu pada replikasi ke 3 pada 250 ppm dan 1000 ppm namun tidak ada kematian pada 2000 ppm hal ini dapat terjadi karena faktor variasi individu, sistem imunitas telur berbeda dan TAB yang digunakan pada replikasi tersebut mempunyai pembuluh darah yang tipis sehingga rentan terjadi kematian pada sub fraksi A dapat disimpulkan fraksi uji tidak toksik. Pada sub fraksi B terjadi

kematian pada replikasi 250 ppm pada replikasi ke 3, 500 ppm pada replikasi ke 1, 1000 ppm pada replikasi ke 1 dan ke 3 serta pada 2000 ppm pada replikasi ke 1. Karena pada sub fraksi B terjadi banyak kematian pada TAB maka pada fraksi ini tidak digunakan dalam penelitian karena bersifat toksik pada TAB.

Pengujian aktivitas antivirus sub fraksi A daun legundi terhadap virus H1N1 pandemik 2009 dilakukan dengan TAB karena telur merupakan media replikasi virus influenza yang baik dan sering digunakan. Untuk mengetahui pertumbuhan virus dalam telur, dapat ditentukan melalui 2 cara, yaitu dengan mengamati kematian embrio dan menguji HA. Pada cara pengamatan kematian embrio dipengaruhi oleh infektivitas virus yang diinokulasikan, jika virus infektivitasnya tinggi, maka embrio mati jika virus bereplikasi, jika virus yang diinokulasikan infektivitasnya rendah, maka belum tentu jika virus bereplikasi embrio akan mati, embrio bisa tetap hidup meskipun virus bereplikasi (Krisnawan, 2011). Berdasarkan hasil pengamatan, kematian embrio tidak terjadi dalam waktu yang sama. Variasi individu TAB sangat mempengaruhi kemampuan embrio untuk bertahan hidup sehingga dilakukan uji hemaglutinasi untuk mengetahui titer virus dalam TAB (Wang *et al.*, 2008).

Uji hemaglutinasi yang dilakukan dengan 0,75% *Red Blood Cells* (RBC) marmot (*Guinea pig*) (WHO, 2011). Sel darah merah marmot merupakan sel darah merah yang lebih sensitif untuk mendeteksi virus influenza (Wiriyarat *et al.*, 2010). Hasil dari uji hemaglutinasi menunjukkan kecenderungan penurunan



titer HA pada sebagian besar TAB yang di inokulasi fraksi legundi. Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa kenaikan konsentrasi sub fraksi A tidak diikuti secara linier dengan kenaikan persen penghambata, dikarenakan replikasi yang terjadi pada virus H1N1 Pandemi 2009 ini sangat unik juga sifat dan mutasi yang terjadi pada virus ini sulit untuk diprediksi. Dari uji HA didapatkan titer HA 1000 ppm mempunyai penghambatan terendah dan tertinggi pada konsentrasi 250 ppm selanjutnya menurun pada dosis 500 ppm dan 1000 ppm kemudian naik kembali pada dosis 2000 ppm sebagai dosis tertinggi. Setelah itu dihitung persen penghambatan kemudian didapatkan data persen penghambatan 125 ppm; penghambatan sebesar 36,66%, 250 ppm sebesar 53,33%; 500 ppm sebesar 39,16%; 1000 ppm sebesar 16,66% dan 2000 ppm sebesar 39,16% terhadap kontrol negatif, sementara untuk kontrol positif, yaitu zanamivir 15  $\mu$ M memiliki persen penghambatan sebesar 70% terhadap kontrol negatif. Dari hasil ini bisa dikatakan pada dosis 2000 ppm tidak meningkatkan presentase penghambatan replikasi virus H1N1. Kemungkinan lain, dosis maksimum penghambatan adalah 250 ppm. Hal itu bisa dilihat dari tren titer HA apabila dosis dinaikkan terjadi penghambatan yang menurun dan kembali naik pada dosis tertinggi namun tidak sebesar pada hambatan tertingginya yaitu pada 250 ppm. Dari penelitian yang ada juga dibuktikan bahwa ekstrak dan fraksi dari beberapa tanaman seperti *Garcinia mangostana*, *Eurycoma longifolia*, *Tabernaemontana divaricata*, *Brucea javanica*, dan *Momordica charantia* memiliki persen penghambatan yang bagus

pada konsentrasi 250 ppm dan memberikan hambatan  $>50\%$  (Ikram, *et al*, 2015).

Pada penelitian sebelumnya didapatkan hasil pada ekstrak metanol legundi mempunyai penghambatan terbesar pada 62,5 ppm dan 250 ppm sebesar 38,83% dan kemudian menurun pada 1000 ppm yaitu 33,33% (Hayati, 2015). Penelitian fraksi uji 1,2 yang sama pada virus yang berbeda yaitu pada H5N1 mempunyai penghambatan terbesar pada 250 ppm dan 500 ppm sebesar 71,25% dan menurun pada 1000 ppm dan 2000 ppm yang penghambatannya sebesar 50% (Putra, 2016). Dari data tersebut terbukti bahwa pada konsentrasi yang sama yaitu 250 ppm antara ekstrak dan fraksi legundi menunjukkan penghambatan tertinggi, namun perbedaannya terletak pada persen penghambatan fraksi yang lebih tinggi yaitu 53,33%. Hal ini dapat terjadi karena pada fraksi telah melewati proses fraksinasi untuk memisahkan komponen senyawa yang tidak diperlukan. Selain itu pada penelitian ini persen penghambatan terbesar hanya 53,33%, hal ini bisa terjadi karena pada penelitian ini yang diujikan masih dalam berbentuk fraksi. Suatu fraksi tidak hanya terdiri dari senyawa tunggal saja melainkan senyawa multikomponen.

Pada penelitian ini senyawa yang diduga memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan virus H1N1 adalah vitexin, dimana vitexin merupakan senyawa tunggal. Pada penelitian ini hambatan menurun pada 1000 ppm dan naik kembali pada 2000 ppm hal ini dapat disebabkan besarnya variabel pada telur antara lain perbedaan genetik antar telur yang diuji, umur yang berbeda,

asal induk yang berbeda, kondisi lingkungan ketika inkubasi dan penyimpanan (Krisnawan, 2011). Pada penelitian serupa yaitu penggunaan telur ayam berembrio sebagai model pembelajaran untuk mengetahui pengaruh terhadap virus influenza A H9N2 menggunakan oseltamivir karboksilat dengan 10 TAB tiap replikasi (Tare *et al.*, 2015). Semakin banyak replikasi maka semakin banyak pula data yang sering muncul sehingga data yang diperoleh lebih baik, namun pada penelitian ini digunakan 3 TAB saja. Hal ini juga merupakan sebab terjadinya data yang fluktuatif. Data fluktuatif tersebut juga sudah di ulangi sampai tiga kali uji hemaaglutinasi dengan menggunakan RBC marmot dengan konsentrasi yang sama namun data yang dihasilkan tetap, pengulangan uji hemaaglutinasi ini bertujuan agar data yang didapatkan lebih akurat. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa sub fraksi A daun legundi dapat menghambat virus H1N1 pandemik 2009 karena terjadi penurunan titer HA dan *Vitex trifolia* sebagai kandidat antivirus yang baru dapat diuji aktivitas penghambatannya terhadap virus influenza yang lain.

Senyawa flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat virus dengan mekanisme NA. Salah satu senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan menghambat virus dengan mekanisme NA adalah Vitexin. Senyawa Vitexin ini dimiliki oleh *Vitex trifolia* (Liu *et al.*, 2008). Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa sub fraksi A daun legundi dapat menghambat virus H1N1 pandemik 2009 melalui mekanisme penghambatan neuraminidase virus, sehingga *Vitex trifolia* diharapkan dapat menjadi sumber

antivirus baru. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme kerja dari senyawa yang menghambat pertumbuhan virus H1N1 Pandemi 2009 dengan uji lain seperti NA assay dan Plaque assay. Juga diperlukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* menggunakan hewan model seperti ferret, serta pengujian aktivitas antivirus dari *Vitex trifolia* terhadap virus influenza jenis lain.



## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1. KESIMPULAN

1. Sub Fraksi A daun *Vitex trifolia* tidak memiliki toksisitas pada TAB sampai konsentrasi tertinggi yaitu 2000 ppm.
2. Sub Fraksi B daun *Vitex trifolia* memiliki toksisitas pada TAB sampai konsentrasi tertinggi yaitu 2000 ppm.
3. Sub Fraksi A daun *Vitex trifolia* memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan virus Influenza H1N1 Pandemi 2009 yaitu 125 ppm; penghambatan sebesar 36,66%, 250 ppm 53,33%; 500 ppm 39,16%; 1000 ppm 16,66%; 2000 ppm 39,16%.

#### 7.2. SARAN

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme kerja dari senyawa yang menghambat pertumbuhan virus H1N1 Pandemi 2009 dengan uji lain seperti NA assay dan Plaque assay.
2. Perlu dilakukan penelitian secara *in vivo* tentang penghambatan virus H1N1 oleh fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* dengan menggunakan hewan model seperti ferret.
3. *Vitex trifolia* sebagai kandidat antivirus yang baru dapat diuji aktivitas penghambatannya terhadap virus influenza yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Baz, Mariana., J, Catherine Lukea., Cheng, Xing., Jin, Hong., Subbarao, Kanta. 2013. H5N1vaccines in humans. *Virus Research* 178 (2013) 78–98.
- Calatayud, L., Lackenby, A., Reynolds, A., McMenamin, J., Phin, N.F., Zambon, M.C., Pebody, R., 2010. *Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus Infection in England and Scotland, 2009-2010*. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct.
- Chasani, Moch. Fitriaji, Ruli Budi. Purwati. 2015. *Fraksinasi Ekstrak Metanol Kulit Batang Ketapang (Terminalia catappa Linn.) Dan Uji Toksisitasnya Dengan Metode Bslt (Brine Shrimp Lethality Test)*. Program Studi Kimia, MIPA, Fakultas Sains dan Teknik. Universitas Jenderal Soedirman.
- Chattopadhyay, Debprasad., Sarkar, Mamta Chawla., Chatterjee, Tapan Rakhi., Bag, Sharma Dey Sekhar, Paromita Chakraborti., Khan., Mahmud Tareq Hassan. 2009. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. *New Biotechnology I* Volume 25 number 5.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2014. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke V. Jakarta: Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. hal. 42.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2010. *Seputar Penanggulangan Pandemi Flu Baru H1N1 oleh Departemen Kesehatan RI*. Diakses 13 Desember 2015. <http://www.depkes.go.id/h1n>.
- Dharmayanti, N.L.P.I., Hewajuli, D.A., Ratnawati, A.K., Indriani R., Darminto, 2010. Karakter genetik protein membran

virus avian influenza subtype H5N1. *JITV*. 15 (3): 231-239.

Dirita dan Dermody, 2007. *Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease, 4th edition*. Engleberg: Chapter 36.

Ehrhardt, C., Hrincius, R.H., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., Ludwig, S., 2007. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Research*. 76: 38-47.

Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. hlm. 323-377; 456-473.

Garjito, T. A. 2013. *Avian Influenza Virus H5N1 : Molecular Biology And Its Transmission Potential From Poultry To Human*. Artikel. Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP).

Gatherer, Derek. 2009. *The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context*. *Journal of Clinical Virology*. 45 (2009) 174–178.

Gonçalves, S, L, J., Leitão, G, S., Monache., Delle, F., Miranda, S, F, M, M., Santos, M,G,M., Romanos, V, T, M., Wigg., D.M. 2001. *In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of Vitex polygama (Verbenaceae).*, *Phytomedicine*. Vol. 8(6), pp.477–480.

Grimes, S.E., 2002. *A Basic Laboratory Manual for the Small-Scale Production and Testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine*. Bangkok: FAO Regional Office of Asia and the Pacific. p. 29, 129.

Handa S.S., Khanuja, S.P.S., Longo G., Rakesh D.D., 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic*

*Plants*. Trieste: International Centre for Sciences and High Technology. p. 22-25.

Hariana, Arief. 2013. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Penebar swadaya., Jakarta. P. 204-205.

Hayati, Arina., 2015. *Pengaruh Ekstrak Daun Vitex Trifolia Terhadap Pertumbuhan Virus Influenza A Subtipe H1N1 Pandemi 2009*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya

Heim, Edgar., 2015. *Flora and vegetation of Bali Indonesia*. Herstellung und Verlag Bod Book on demands Norderstedt. Page 148-149.

Hendayana, S., 2006. *Kimia Pemisahan*. Bandung: Penerbit Remaja Rosda Karya.

Horimoto , Taisuke., Kawaoka, Yoshihiro. 2005. influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature review microbiology* voume 3 page 591.

Hudson, J.B. 2009. The use of herbal extracts in the control of influenza review. *Journal of Medicinal research*, Vol. 3(13), p.1189-1195.

<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=vitr7>(diakses pada tanggal 19 november 2015 pada Pukul 20.00 WIB)

<http://www.depkes.go.id/index.php?txtKeyword=Kasus+flu+burung&act=searchaction&pgnumber=0&charindex=&strucid=&fullcontent=&CALL=1&C1=1&C2=1&C3=1&C4=1&C5=1> (diakses tanggal 13 Desember 2015 pukul 08.00).

<http://www.depkes.go.id/index.php?txtKeyword=H5N1&act=searchaction&pgnumber=0&charindex=&strucid=&fullcontent=&CALL=1&C1=1&C2=1&C3=1&C4=1&C5=1>.(diakses pada tanggal 19 november 2015 pada Pukul 21.00 WIB)



- Ikram, Nur Kusaira Khairul., Durrand, Jacob D., Muchtaridi, Muchtaridi., Zalaludin, Ayunni Salihah., Purwitasari, Neny., Mohamed, Nornisah., Rahim, Aisyah Saad Abdul., Lam, Chan Kit., Normi, Yahaya M., Rahman, Noorsaadah Abd., Amaro, Rommie E., Wahab, Habibah A. 2015. *A Virtual Screening Approach For Identifying Plants with Anti H5N1Neuraminidase Activity*. J. Chem. Inf. Model. 2015, 55, 308 –316.
- Jangwan, J.S., Aquino, R.P., Mencheherini, T., Picerno, P., and Singh, R., 2013. *Chemical constituents of ethano extract of leaver and molluscidal activity of crude extraxts of Vitex trifolia Linn*. Herba Polonica, Vol. 59 No. 4, p. 19-32.
- John, K.M.M., Enkhtaivan, G., Ayyanar, M., Jin, K.J, Yeon, J.B., Kim, D.H., 2014. Screening of ethnic medicinal plants of South India against Influenza (H1N1) and their antioxidant activity. *Saudi Journal of biological Science*. Vol. 22(2), p.191-197.
- King M., D., Guentzel M.N., Arulanandam B. P., Lupiani B., Chambers j. p.,2009. *Proteolytic bacteria in the lower digestive tract of poultry may affect avian influenza virus pathogenicity*. Poultry Science Association Inc., pp 1388-1393.
- Krisnawan, A.H., 2011. *Aktivitas antivirus hasil fermentasi Streptomyces spp. Terhadap virus influenza pandemi H1N1-2009*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Laxmikant, Kulkarni. (2012) *Vitex trifolia linn (Verbenaceae): A Review on Pharmalogical and Biological Effects, Isolated and Known Potential Phytoconstituents of Therapeutic Importance*. *Int. J. Res. Pharm. Sci*, 3 (3), 441-445.
- Lee, Chul., Lee, Woo, Jin., Jin, Qinghao., Lee, Ju, Hak, Lee., Sung-Joon., Lee, Dongho, Lee, Koo, Myung., Lee, Kil,

- Chong., Hong, Tae, Jin., Lee, Kyeong, Mi., Hwang.,Yeon., Bang. 2013. Anti-inflammatory constituents from the fruits of *Vitex rotundifolia*., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* xxx (2013) xxx- xxx.
- Lestari, Widyaphiana, I.P., 2015. *Aktifitas ekstrak Daun Vitex trifolia sebagai antivirus H5N1 (Flu Burung)*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.
- Liu, Wen-Xin., Cui , Cheng-Bin., Cai Bing., Wang , Hai-Yan., Yao, Xin-Sheng. 2005. *Journal of Asian Natural Products Research*, Vol. 7, No. 4, August 2005, 615–626.
- Lombardo, T., Chiapponi, Chiara., Baioni, Laura., Cinotti, Stefano., Ferrari, Maura., 2015. Protein mutations following adaptation of avian influenza viruses indifferent biological systems. *Research in Veterinary Science* 103 (2015) 176–178.
- Mahardika, I.G.N.K., Sukada, I.M., Antara, M.S., Suartini, N.G.A.A., 2008. Motif sekuens asam amino pembentuk kantong pengikat Oseltamivir pada protein neuraminidase virus avian influenza (H5N1) asal manusia dan hewan di Indonesia. *Jurnal Veteriner*. Vol. 9, No. 4: 204-206.
- Matsui, M., Kumar-Roine, S., Darius, H.T., Chinain, M., Laurent, D., Paulillac, S. (2009). Characterisation of The Anti-Inflammatory Potentil of *Vitex trifolia* L. (Labiateae), A Multipurpose Plant of The Pacific Traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 126 (2009) 427-433.
- Maryanto, Ibnu., Sudiana, Made, I., Arifiani., Deby., Fijridiyanto, Andry, Izu. 2011. *Jurnal Biologi Indonesia diterbitkan oleh Perhimpunan Biologi Indonesia*. Pusat Penelitian Biologi-LIPI.
- Mentri Kesehatan Republik Indonesia 2015. <http://mediakom.sehatnegeriku.com/virus-h1n1->

masyarakat-harus-tetap-waspada/ diakses tanggal 9 Desember 2015.

Min, Ji-Young., Subbarao, Kanta. 2010. Cellular Target From Influenza Drugs. *Nature Of Biotechnology*. 28. 239-240.

Mohammad, Kartono. 2005. *Flu Burung*. Buku Avian Influenza adapted from www.influenzareport.com.

Muchid, Abdul, dkk., *Pharmaceutical Care Untuk Pasien Flu Burung*. 2007. Direktorat bina farmasi komunitas dan klinik ditjen bina kefarmasian dan alat kesehatan departemen kesehatan.

Murtini, Sri., Murwani, R., Satrija, F., MaloleM.B.M., 2006., Penetapan rute dan dosis inokulasi pada telur ayam berembrio sebagai media uji khasiat ekstrak benalu teh (*scurrula oortiana*)., *JITV*. Vol. 11 No. 2 Th. 2006.

Nidom, R.V., 2009. *Aktivitas Antiviral 5 Tanaman Indonesia Terhadap Virus Avian Influenza Subtipe H5N1*. Tesis. Fakultas Farmasi Unair, Surabaya.

Nugroho, Endro, Agung., Alam, Gemini. 2005. *Review Tanaman Obat Legundi (Vitex Trifolia L.)*, Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA Universitas Hasanudin Makassar.

Phing, SHI., Geng Shu.,Ting-ting LI., Yu-shuiLI., Ting1FENG., Hua-nanWU.2015. Methods to detect avian influenza virus for food safety surveillance. *Journal of Integrative Agriculture* 2015, 14(11): 2296–2308.

Purnomo, Bambang. (2005) *Bahan Bacaan Kuliah: Dasar-Dasar Mikrobiologi*. PS. IHPT.Faperta Unib.

- Purwitasari, Nyeny. Studiawan, Herra. Rahmawati, Kadek. 2015. Aktivitas antivirus influenza dari ekstrak metanol buah *Momordica charantia*. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Vol.2 No.2.
- Putra, david, Fransnado, G.P., 2016. *Pengaruh Fraksi Etil Asetat Daun Vitex trifolia terhadap pertumbuhan virus Avian Influenza A subtype H5N1*. Skripsi. Fakultas farmasi Universitas Airlangga Surabaya.
- Rahdiansyah, Mochamad, Reza., 2010. *Perancangan Inhibitor M2 Proton Channel Virus Influenza A Subtipe H1N1 Melalui Docking Dan Simulasi Dinamika Molekul*. Tesis. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Ilmu Kimia Universitas Indonesia.
- Ramadhani, Roshinta, Anggun. Kusriani, Dewi., Fachriyah, Enny. 2013. *Isolasi, Identifikasi Dan Uji Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Ekstrak Etil Asetat Daun Tempuyung (Sonchus arvensis L.)*. Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Diponegoro Semarang. Vol 1, No 1, Hal 247 – 255.
- Sawai, Reiko., Kurodab, Kazumichi., Shibatab ,Toshikatsu, Gomyoub, Rieko., Osawaa, Kenji., Shimizu,Kazufumi. 2008. Anti-influenza virus activity of *Chaenomeles sinensis*. *Journal of Ethnopharmacology*.118 (2008) 108–112.
- Serkedjieva, J., Gegova G., Mladenov, K..2007. Protective efficacy of an aerosol preparation, obtained from *Geranium sanguineum L.*, in experimental influenza infection. *Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Centre of Immunology, Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria*.

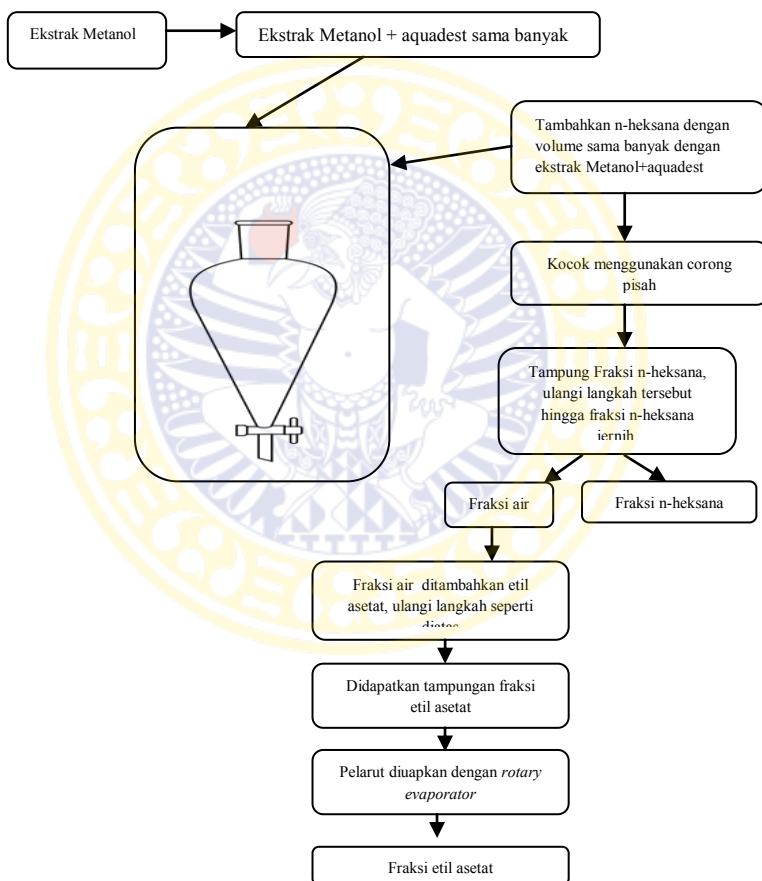
- Setiyono, Agus., Bermawie, Nurliani. Potensi Tanaman Obat untuk Penanggulangan Flu Burung: Uji In Vitro pada Sel Vero. *Jurnal Sain Veteriner* 31 (1).
- Serkedjjeva J., Angelova L., Remichkova M., Ivanova I., 2006. Proteinase inhibitors from *Streptomyces* with antiviral activity. *J. Basic Microbiol.*46, pp 504-512.
- Spackman, Erica. 2008. *Methods in Molecular Biology Avian Influenza Virus*. Humana Press page 2.
- Steenis C.G.G.J, Van., 2008. *Flora*. Jakarta: Pradnya Paramita.p.510.
- Syarif, Amir., dkk.2012. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Departemen Farmakologi dan terapeitik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.Halaman 646.
- Tare, Deeksha S., Pawar, Shailesh D. 2015. Use of embryonated chicken egg as a model to study the susceptibility of avian influenza H9N2 viruses to oseltamivir carboxylate. *Journal of Virological Methods*224. (2015) 67–72.
- Untari, Tri., Widyarini, Sitarina., Wibowo, M.H. 2012. Aktivitas Antiviral Minyak atsiri Jahe Merah terhadap Virus Flu Burung. *Jurnal Veteriner* Vol. 13 No. 3: 309-312 ISSN : 1411 – 8327.
- Wang, J.X., Zhou, J.Y., Yang, Q.W., Chen, Y., Li, X., Piao, Y.A., Li, H.Y. 2008. An improved embryonated chicken egg model for the evaluation of antiviral drugs against influenza A virus.*Journal of Virological Method.* 153: 218-222.
- Wang, G.W., Hu, W.T., Huang, B.K., and Qin, L.P., 2011. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 136 (2011) 10–20.

- WHO. (2011) *Manual for The Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza*. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Wiriyarat, Witthawat. Lerdsamran, Hatairat , Pooruk, Phisanu. Webster, Robert G.Louisirochanakul, Suda. Ratanakorn, Parntep. Chaichoune, Kridsada. Nateerom, Kannika. Puthavathana, Pilaipan. 2010. Erythrocyte binding preference of 16 subtypes of low pathogenic avian influenza and 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses. *Veterinary Microbiology* 146 (2010) 346–349.
- Yuswantina, Richa. 2009. *Uji aktivitas penangkap radikal dari ekstrak petroleum eter,etil asetat dan etanol rhizoma Binahong (Anredera cordifolia (tenore) steen) dengan metode dpph (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Zainudin, Muhammad. 2014. *Metodologi Penelitian Kefarmasian dan Kesehatan*. Airlangga University Press Kampus C unair Surabaya. Halaman 39-40.

LAMPIRAN

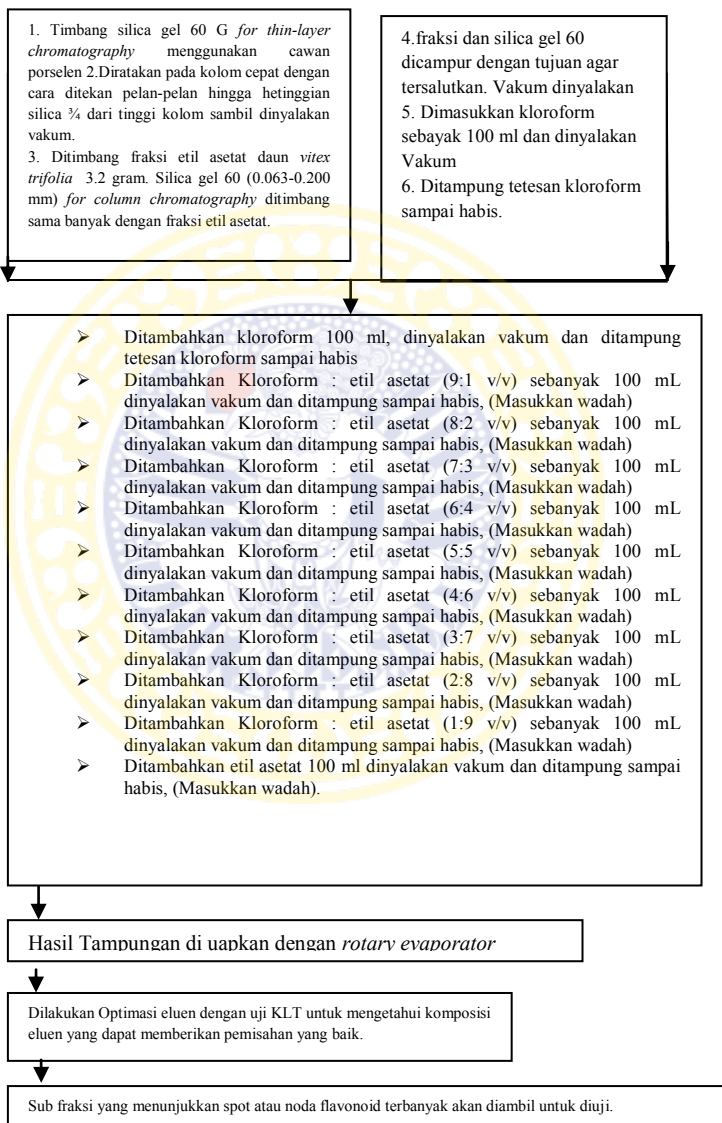
Lampiran 1

Skema Prosedur Fraksinasi Daun *Vitex trifolia* L.



## Lampiran 2

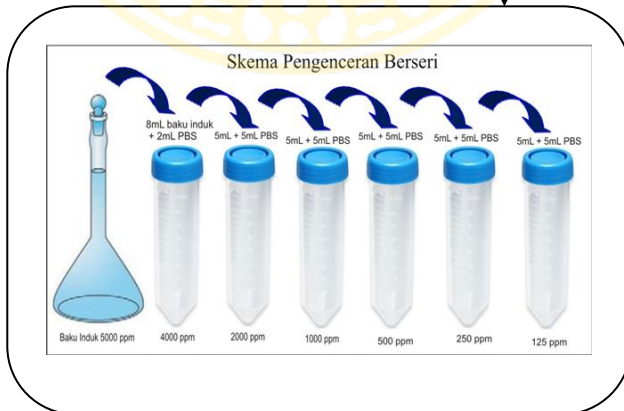
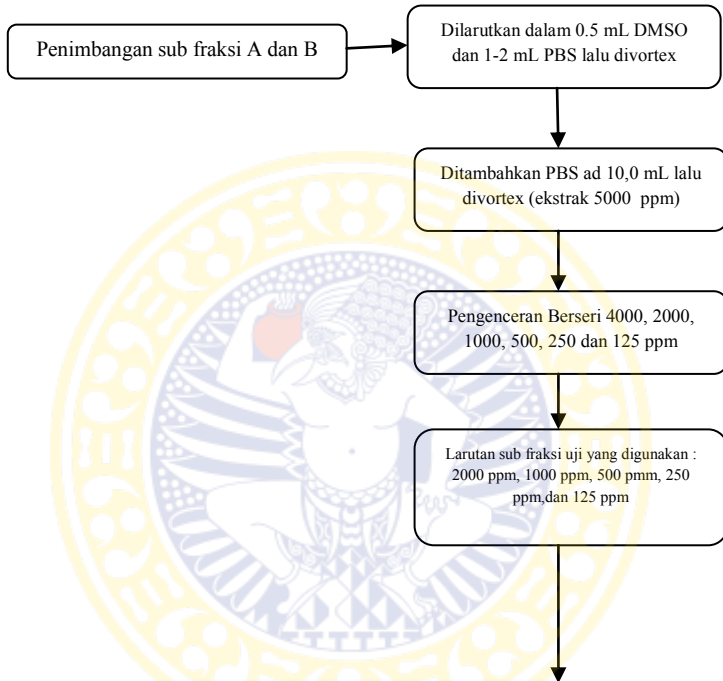
## Skema Prosedur Kromatografi Kolom Vakum Sub Fraksi





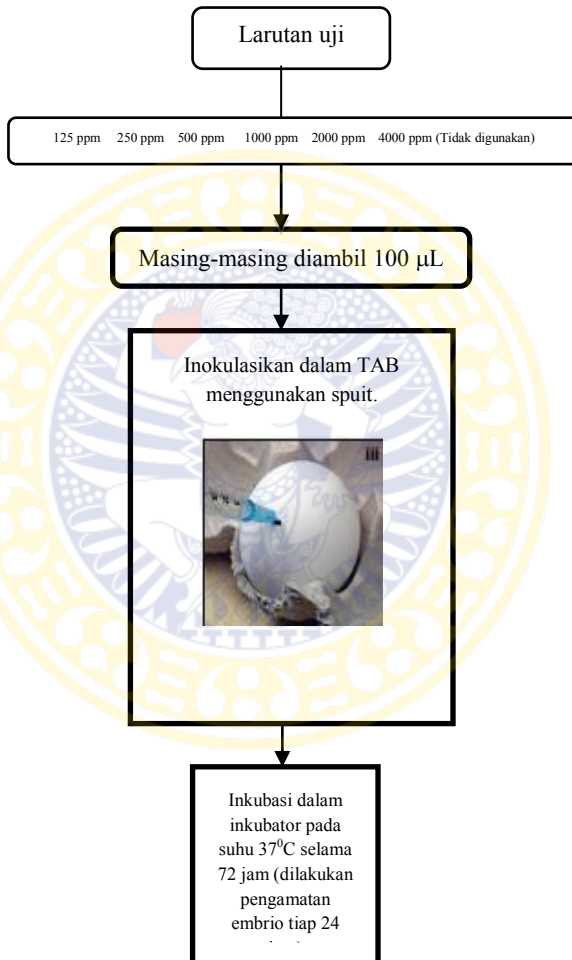
**Lampiran 3**

**Skema Prosedur Kerja Pembuatan Larutan Induk**



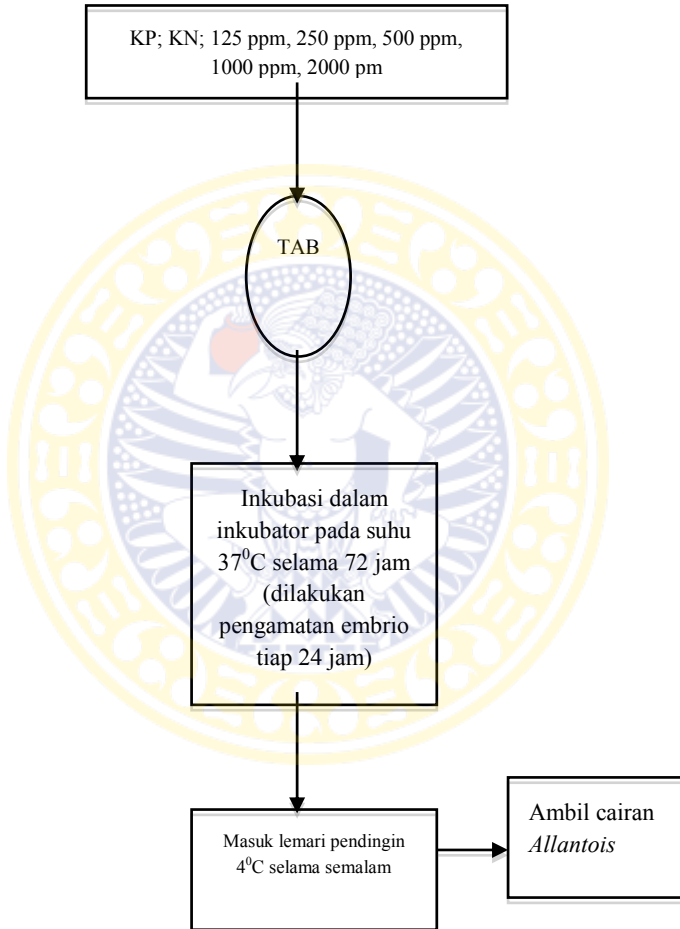
Lampiran 4

Skema Prosedur Kerja Uji Dosis Aman



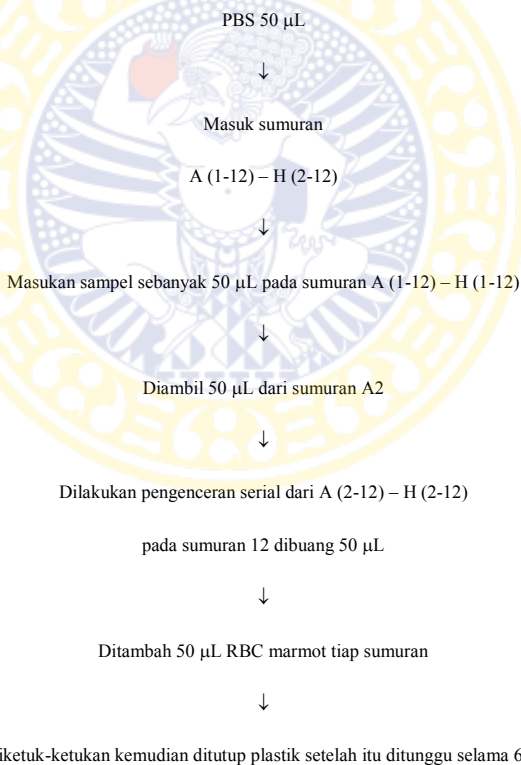
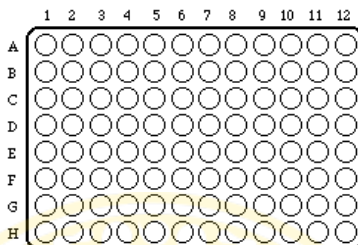
Lampiran 5

Skema prosedur kerja Inokulasi Pada TAB



## Lampiran 6

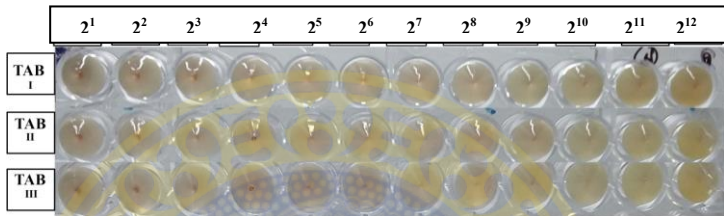
## Skema prosedur kerja Uji Hemaaglutinasi (HA Test)



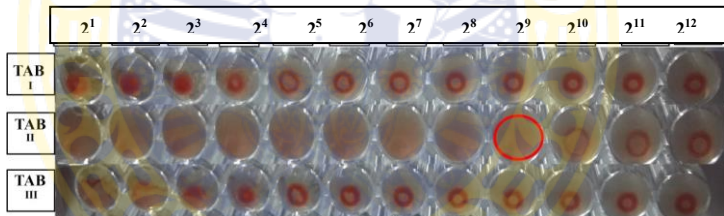
**Lampiran 7**

**Titer HA Hasil Uji Hemaaglutinasi**

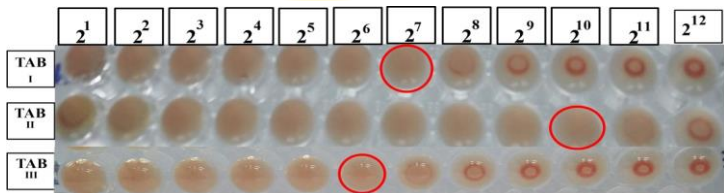
**A. Kontrol Negatif H1N1 pandemik 2009**



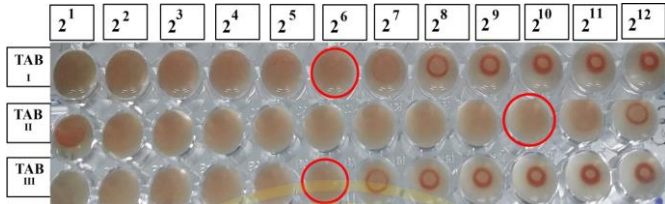
**B. Kontrol Positif H1N1 pandemik 2009**



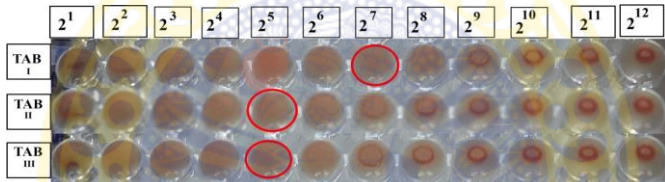
**C. Sub Fraksi A daun legundi 125 ppm**



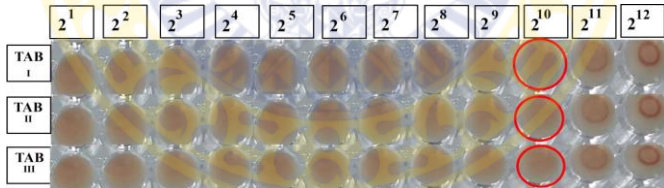
D. Sub Fraksi A daun legundi 250 ppm



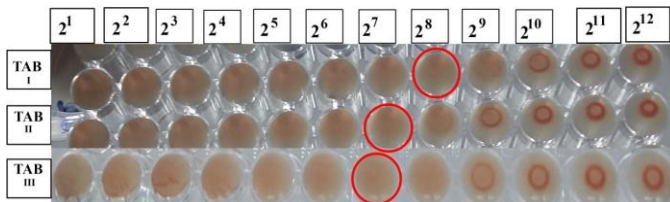
E. Sub Fraksi A daun legundi 500 ppm



F. Sub Fraksi A daun legundi 1000 ppm



G. Sub Fraksi A daun legundi 2000 ppm



## Lampiran 8

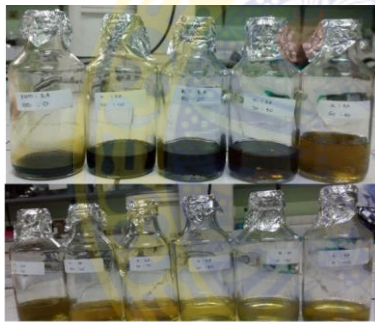
### Proses Pembuatan Fraksi Legundi dan Sub Fraksinya



Persiapan Kromatografi Kolom Vakum



Proses Fraksinasi



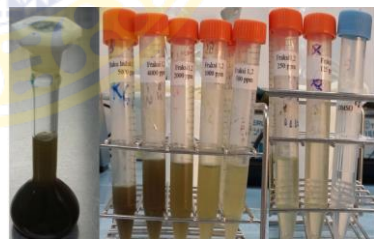
Hasil Kromatografi Kolom Vakum



Proses Penguapan Pelarut



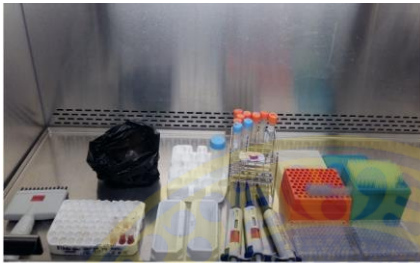
Fraksi yang digunakan



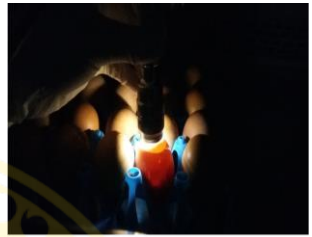
Fraksi yang digunakan

## Lampiran 9

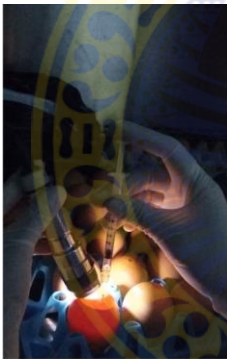
### Proses Uji Aktivitas pada TAB



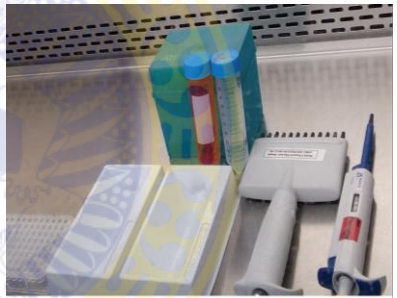
Persiapan sampel dan virus



Candling TAB



Injeksi sampel dan virus



Uji HA



Pemanenan cairan alantois

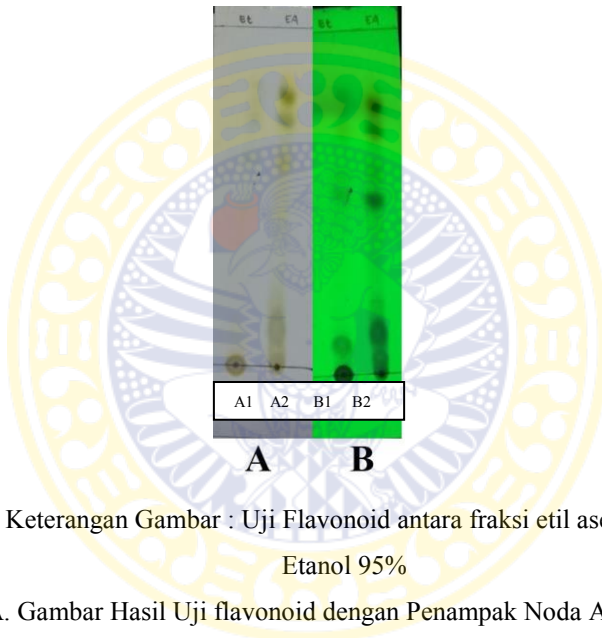


Inkubasi TAB dalam Inkubator



**Lampiran 10**

**Perbandingan Uji Flavonoid antara fraksi etil asetat dan Etanol 95% Sebagai dasar pemilihan pelarut**



Keterangan Gambar : Uji Flavonoid antara fraksi etil asetat dan Etanol 95%

A. Gambar Hasil Uji flavonoid dengan Penampak Noda Amonia

A1 : Fraksi Etanol 95%

A2 : Fraksi etil Asetat

B. Gambar Hasil Uji flavonoid dengan sinar UV 254nm

B1 : Fraksi Etanol 95%

B2 : Fraksi etil Asetat