

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

SKRIPSI

**PENGARUH FRAKSI FLAVONOID DAUN *Vitex trifolia*
TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS INFLUENZA A
SUBTIPE H5N1**



DAVID FRANSNADO GRISMANA PUTRA

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

2016

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

SKRIPSI

**PENGARUH FRAKSI FLAVONOID DAUN *Vitex trifolia*
TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS INFLUENZA A
SUBTIPE H5N1**



**DAVID FRANSNADO GRISMANA PUTRA
051211131046**

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

2016



SURAT PERNYATAAN

Yang bertandatangan di bawah ini saya mahasiswa skripsi :

Nama : David Fransnado Grismana Putra
NIM : 051211131046

Menjelaskan dengan sesungguhnya bahwa, skripsi Dengan Judul Utama: **Pengaruh Fraksi Flavonoid Daun *Vitex trifolia* Terhadap Pertumbuhan Virus Influenza A Subtipe H5N1** merupakan penelitian yang ide dasar, serta pendanaan riset sepenuhnya dilakukan oleh dosen pemilik proyek : **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 tersebut.

Demikian surat pernyataan ini dibuat dengan seksama untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya, sehingga kegiatan publikasi dan pengajuan HAKI yang dilakukan oleh dosen tersebut 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,



David Fransnado G.P
NIM : 051211131046

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul: PENGARUH FRAKSI FLAVONOID DAUN *Vitex trifolia* TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS INFLUENZA A SUBTIPE H5N1 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 sebenar-benarnya.

Surabaya, 17 Agustus 2016



David Fransnado G.P.

NIM. 051211131046

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan, bahwa sesungguhnya hasil skripsi/tugas akhir ini adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini menggunakan data fiktif atau merupakan hasil dari plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau ada pencabutan gelar yang saya peroleh.

Surabaya, 17 Agustus 2016



David Fransnado G.P.

NIM. 051211131046

Lembar Pengesahan

**PENGARUH FRAKSI FLAVONOID DAUN *Vitex trifolia*
TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS INFLUENZA A
SUBTIPE H5N1**

SKRIPSI

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

2016

Oleh:

DAVID FRANSNADO GRISMANA PUTRA

NIM. 051211131046

Pembimbing Utama



Drs. Herra Studiawan, MS.

NIP. 195703101986011001

Pembimbing Serta



Prof. Dr. C.A. Nidom, drh., MS.

NIP. 1958003081984031003

Segala puji syukur hanya bagi Tuhan Yang Maha Esa, oleh karena anugerah-Nya yang melimpah, kemurahan dan kasih setia yang besar akhirnya saya dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul PENGARUH FRAKSI FLAVONOID DAUN *Vitex trifolia* TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS INFLUENZA A SUBTIPE H5N1 yang merupakan salah satu syarat guna memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

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

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan program pendidikan S-1 Pendidikan Apoteker
2. Ketua Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Dr. Aty Widyawaruyanti, MSi yang telah memberikan kesempatan dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Kepala Laboratorium Avian Influenza Research Center (AIRC) UNAIR, Prof. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., M.S selaku pembimbing serta, atas segala waktu, kesabaran, bimbingan, masukan, serta sarana dan fasilitas yang disediakan selama proses penyelesaian skripsi ini.

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

4. Drs. Herra Studiawan, MS., Selaku pembimbing utama, atas segala waktu, kesabaran, ketelitian, bimbingan serta masukan selama proses penyelesaian skripsi ini.
5. Neny Purwitasari S.Farm., M.Sc.Apt. dan Prof. Dr. Bambang Prajogo, MS. Selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak saran dan masukan hingga terselesaikan skripsi ini.
6. Orang tua (Kuswadi S.Pd dan Miming Dwi Wahyuningsih), yang telah tulus ikhlas memberikan kasih sayang, cinta, doa, perhatian, dukungan moral dan material yang telah diberikan selama ini. Terimakasih telah meluangkan segenap waktunya untuk mengasuh, mendidik, membimbing dan mengiringi perjalanan hidup saya dengan diiringi alunan doa yang tiada henti agar saya bisa sukses dalam menggapai cita-cita. Untuk Bapak Soedewo Tasmu dan Ibuk Hariningsih Eliyas, Bapak D.Siswanto, serta untuk kakak terkasih (Dhiana Yuanita Ike Natalia dan Matheus Maryanto) serta keluarga dan semua orang terkasih terimakasih sudah menggandeng tangan saya dalam doa sehingga saya dapat dengan lancar menempuh pendidikan S-1 Pendidikan Apoteker.
7. Khoirotin Nisak, S. Farm., Apt Selaku dosen wali atas segala bimbingan dan perhatian selama menjalankan program S-1 Pendidikan Apoteker
8. Seluruh staff pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas bekal ilmu yang diberikan selama masa pendidikan.
9. Seluruh karyawan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, khususnya Ruang Praktikum Farmakognosi dan

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Fitokimia, Pak Jarwo, Pak Iwan, Pak Parto dan Pak Lismo atas semua bantuan waktu dan tenaga selama penyelesaian skripsi ini.

10. Seluruh staf Laboratorium AIRC (Mbak Ire, Mbak Vivin, Mbak Lia, Mbak Anis, Mbak Elsa, Mas Yusuf, Bu kadek, Bu Ema, Pak Surip, Pak Hendro) atas segala waktu, saran dan tenaga selama penyelesaian skripsi ini.
11. Teman seperjuangan antivirus influenza 2016 Krisma Agung Subarka atas kerjasama, dukungan, semangat dan kebersamaan selama penelitian berlangsung.
12. Teman seperjuangan dari Fakultas Kedokteran Hewan Aprilliani atas ajaran, bantuan, dukungan, kerjasama, semangat dan kebersamaan selama penelitian berlangsung. Dan juga teman-teman dari FKH lainnya (Mbak Uun, Mbak Yuan, Imron, Mei, Ryne, Ninis dan Rediana) terimakasih atas dukungan, semangat dan kebersamaan yang terjalin di penelitian ini.
13. Sahabat-sahabat (Eva, Rani, Noer, Komang, Satrio, Liga, Wina), Amoksilin 2012, PD Pharma, Amoksilin C 2012, Anak-anak Terang, untuk setiap bantuan, semangat, dan dukungan baik secara langsung maupun tidak langsung yang diberikan kepada saya selama proses penyelesaian skripsi ini.
14. Semua pihak yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung selama penyelesaian skripsi ini, atas segala dukungan diberikan kepada saya.

Surabaya, 17 Agustus 2016

Penulis

RINGKASAN

**PENGARUH FRAKSI FLAVONOID DAUN *Vitex trifolia*
TERHADAP PERTUMBUHAN VIRUS INFLUENZA A
SUBTIPE H5N1**

Beberapa tahun terakhir ini perhatian dunia kesehatan terpusat kepada semakin merebaknya penularan avian influenza A (H5N1). Kasus infeksi pada manusia karena virus avian influenza H5N1 pertama kali dilaporkan di Hongkong pada tahun 1997. WHO meningkatkan peringatan pandemik menjadi level 6 berdasarkan jumlah negara yang melaporkan kasus H1N1 2009. Virus tersebut menyebar dengan cepat di seluruh dunia dan menginfeksi manusia terutama anak-anak dan remaja. Sejak tahun 2003 hingga Juli 2016, jumlah total kasus influenza A (H5N1) pada manusia diseluruh dunia adalah 854 kasus dengan 450 kematian. Sementara itu, jumlah kumulatif kasus konfirmasi Flu Burung di Indonesia adalah 199 kasus dengan 167 kematian.

Dua inhibitor NA Zanamivir (Relenza) dan Oseltamivir (Tamiflu), digunakan untuk mencegah dan mengobati infeksi influenza. Namun, penggunaan jangka panjang obat ini dapat menyebabkan munculnya dan penyebaran resistan terhadap obat mutan; apalagi, penggunaan obat ini juga dibatasi oleh mereka toksisitas yang tinggi. Oleh karena itu, penemuan dan pengembangan obat baru sangat dibutuhkan untuk mengatasi keterbatasan obat saat ini, seperti efek samping yang tidak diinginkan dan munculnya strain yang resistan terhadap obat.

Pada penelitian sebelumnya ekstrak metanol daun *Vitex trifolia* bisa menghambat pertumbuhan virus influenza A sub tipe H5N1 dengan mekanisme penghambatan neuraminidase. Penelitian ini menggunakan Fraksi Flavonoid daun *Vitex trifolia* untuk mengetahui apakah fraksi tersebut aman terhadap telur ayam berembrio (TAB) dan apakah memiliki aktivitas sebagai antivirus terhadap virus influenza A sub tipe H5N1. Media yang digunakan

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

dalam penelitian ini yaitu menggunakan media TAB. Setelah itu dilakukan uji HA, untuk mengetahui titer HA virus.

Setelah dilakukan inkubasi selama 72 jam, tidak ditemukan kematian pada TAB, sehingga bisa dinyatakan bahwa fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* aman untuk digunakan dan bisa digunakan untuk uji antivirus H5N1. Hasil uji HA menunjukkan semakin tinggi dosis yang digunakan, bukan berarti semakin tinggi penghambatannya. Dibuktikan dengan hasil uji HA, konsentrasi 125 ppm mempunyai penghambatan paling rendah yaitu 37 %, 250 ppm dan 500 ppm merupakan konsentrasi paling tinggi penghambatannya yaitu sebesar 71,25 %, sedangkan konsentrasi 1000 ppm dan 2000ppm konsentrasi penghambatan turun, namun stabil persentase penghambatannya sebesar 50%.



ABSTRACT

**Activity of *Vitex trifolia* Leaves Part of Fraction Flavonoid as
Antiviral for H5N1**

Since 2003 until July 2016, WHO reported 854 influenza A (H5N1) case in humans which caused 450 deaths worldwide. In Indonesia it is reported 199 case which caused 167 deaths. Due to the resistance of current antiviral drugs used to treat H5N1 infection, new antiviral is strongly needed. Many studies have reported antiviral activity of some bioactive compounds from plants against several viruses. This raised a concern to utilize plants as a source of new antiviral agents. *Vitex trifolia* is one of Indonesia medicinal plants which have been reported to have several biological activities. Previous study has been resulted the activity of methanolic extract of *Vitex trifolia* leaves inhibited the growth of H5N1 virus. In this study the flavonoid sub fraction of *Vitex trifolia* leaves antiviral activity was investigated. The inhibitory activity flavonoid fraction of *Vitex trifolia* leaves against the H5N1 viruses was tested using hemagglutination (HA) assay method. In HA assay, it is found that 250 ppm, the fraction showed 71.25 % of titer reduction. Results concluded that *Vitex trifolia* leaves ethyl acetate fraction could inhibit the H5N1 viruses.

Keywords : *Vitex trifolia*, H5N1, antiviral, hemagglutination assay.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN	ix
ABSTRACT	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	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Tinjauan Tentang Tanaman <i>Vitex trifolium</i>	7
2.1.1. Identitas Tanama	7
2.1.2. Sinonim dan Nama Daerah <i>Vitex trifolia</i>	8
2.1.3. Penyebaran	8
2.1.4. Morfologi <i>Vitex trifolia</i>	8
2.1.5. Kandungan <i>Vitex trifolia</i>	9
2.1.6. Manfaat <i>Vitex trifolia</i>	10
2.2. Tinjauan Tentang Ekstraksi	10
2.2.1. Definisi Ekstraksi	10
2.2.2. Definisi Ekstrak	11
2.2.3. Pembuatan Ekstrak	11

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

2.2.3.1. Pembuatan Serbuk Simplisia.....	11
2.2.3.2. Cairan Pelarut	12
2.2.3.3. Pemekatan/Penguapan (Vaporasi dan evaporasi)	13
2.2.3.4. Pengeringan Ekstrak	13
2.2.3.5. Rendemen	14
2.2.4. Metode Ekstraksi	14
2.2.4.1. Ekstraksi Dengan Menggunakan Pelarut	14
A . Cara Dingin	14
A.1. Maserasi	14
A.2. Perkolasi	15
B. Cara panas	15
B.1. Refluks	15
B.2. Soxhlet	15
B.3. Digesti	15
B.4. Infus	16
B.5. Dekok	16
2.2.4.2. Destilasi Uap	16
2.2.4.3. Cara Ekstraksi Lainnya	16
a). Ekstraksi Bekerjasama	17
b). Superkritikal Karbondioksida	17
c). Ekstraksi Ultrasonik	17
d). Ekstraksi Energi Listrik	17
2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	17
2.3.1 Definisi KLT	17
2.4 Tinjauan tentang Fraksi	18
2.5. Tinjauan Tentang Virus	18
2.5.1 Virus	18

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

2.5.2 Virus Influenza	19
2.5.3 Virus influenza pandemik H5N1	19
2.5.4 Replikasi Virus Influenza	20
2.6. Antivirus Influenza	20
2.6.1 Tinjauan tentang Obat Antiviral	25
2.6.1.1 Oseltamivir	25
2.6.1.2 Zanamivir	29
2.6.1.3 Amantadine dan Rimantadin.....	33
2.7. Uji Antivirus Influenza.....	35
2.7.1. Uji Hemaglutinin (HA)	35
2.8. Neuraminidase	35
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	37
BAB IV METODE PENELITIAN	42
4.1. Variabel Penelitian	42
4.1.1. Variabel Bebas	42
4.1.2. Variabel Tergantung	42
4.1.3. Variabel Kontrol	42
4.2. Bahan	43
4.2.1. Sampel	43
4.2.2. Virus dan Media Pengujian	43
4.2.3. Bahan Kimia	43
4.3. Alat	43
4.4. Prosedur Kerja	44
4.4.1. Pembuatan Ekstrak daun <i>Vitex trifolia</i>	44
4.4.2. Pembuatan Fraksi flavonoid daun <i>Vitex trifolia</i>	44
4.4.3 kromatografi kolom vakum dari fraksi flavonoid daun <i>Vitex trifolia</i>	45
4.4.4. Pembuatan Larutan Phosphate Buffered Saline (PBS)	47

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

4.4.5. Pembuatan Larutan Induk fraksi flavonoid 1000 ppm	.47
4.4.6. Pengenceran Berseri Larutan Induk fraksi flavonoid 1000 ppm	47
4.4.7. Menentukan Dosis Aman dari Fraksi flavonoid daun <i>Vitex trifolia</i>	48
4.4.8. Inokulasi Pada TAB	49
4.4.9. Panen Virus	50
4.4.10. Tes Hemaglutinasi (Uji HA)	51
4.4.10.1. Analisis Data Uji HA	52
Kerangka operasional	53
BAB V HASIL PENELITIAN	54
5.1 Pembuatan Fraksi flavonoid daun <i>Vitex trifolia</i>	55
5.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	56
5.3. Hasil Uji dosis aman Pada Telur Ayam Berembrio (TAB)	60
5.4 Hasil Uji Aktivitas antivirus H5N1 pada TAB	63
5.5 Penentuan IC50 fraksi flavonoid daun <i>Vitex trifolia</i> terhadap Virus H5N1	65
BAB VI PEMBAHASAN	67
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	72
7.1 Kesimpulan.....	72
7.2 Saran	72
Daftar pustaka	73
Lampiran	78

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 5.1 Kode Fraksi dan Perbandingannya	55
Tabel 5.2 Hasil uji dosis aman fraksi flavonoid daun <i>Vitex trifolia</i> pada TAB	60
Tabel 5.3 Hasil uji dosis aman fraksi flavonoid daun <i>Vitex trifolia</i> pada TAB	61
Tabel 5.4 Pengamatan pada TAB setelah injeksi virus influenza A subtipe H5N1 dan fraksi flavonoid daun <i>Vitex trifolia</i>	63
Tabel 5.5 Hasil uji HA pada uji aktivitas terhadap virus influenza A subtipe H5N1	64
Tabel 5.6 log konsentrasi fraksi flavonoid dan persen penghambatan	66

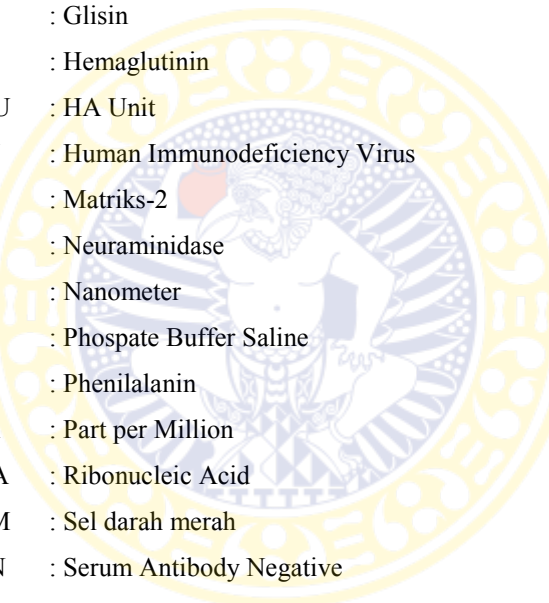
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 <i>Vitex trifolia</i>	7
Gambar 2.2 Struktur molekul dari Vitexin	9
Gambar 2.3 Virus Influenza	20
Gambar 2.4 Virus Influenza	22
Gambar 2.5 Replikasi Virus influenza	24
Gambar 2.6 Struktur molekul Zanamivir (a) dan Oseltamivir (b)	34
Gambar 2.7 Struktur molekul Amantadine (a) dan Rimantadine (b)	34
Gambar 3.1 Pengaruh Fraksi Flavonoid daun <i>Vitex trifolia</i> terhadap virus influenza a subtype H5N1	41
Gambar 4.1 Inokulasi pada TAB	50
Gambar 4.2 <i>well plate-96</i>	52
Gambar 4.3 Kerangka konseptual	53
Gambar 5.1 pemisahan senyawa flavonoid dengan KLT	57
Gambar 5.2 pemisahan senyawa flavonoid dengan KLT	58
Gambar 5.3 pemisahan senyawa flavonoid dengan KLT	59
Gambar 5.4 Grafik penghambatan Fraksi Flavonoid terhadap Virus H5N1	65
Gambar 5.5 Grafik penghambatan Fraksi Flavonoid terhadap Virus H5N1	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
Skema Prosedur Pembuatan Ekstrak Metanol	78
Skema Prosedur Fraksinasi Daun <i>Vitex trifolia</i>	79
Skema Prosedur Kromatografi Kolom Vakum Fraksi flavonoid	80
Skema prosedur kerja penimbangan Fraksi flavonoid.....	81
Skem prosedur kerja pembuatan larutan induk	82
Skema prosedur kerja pengenceran berseri	83
Skema prosedur kerja uji toksisitas dan pemilihan konsentrasi ekstrak	84
Skema prosedur kerja Inokulasi Pada TAB.....	85
Skema prosedur kerja Uji Hemaglutinasi (HA Test).....	86
Titer HA Hasil Uji Hemaglutinasi	87
Proses Pembuatan Fraksi Legundi	89
Proses uji HA	90

DAFTAR SINGKATAN



Ala	: Alanin
Arg	: Arginin
Asn	: Asparagin
DMSO	: Dimetilsulfoksida
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
G	: Glisin
HA	: Hemaglutinin
HAU	: HA Unit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
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
μL	: Mikroliter
μM	: Mikromolar

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Beberapa tahun terakhir ini perhatian dunia kesehatan terpusat kepada semakin merebaknya penularan avian influenza A (H5N1). Meningkatnya kasus infeksi H5N1 yang menyebabkan kematian pada manusia sangat diawatirkan dapat berkembang menjadi wabah pandemi yang berbahaya bagi umat manusia (Radji M, 2006). Diawali pada tahun 1918 dunia digemparkan dengan adanya wabah pandemi yang disebabkan oleh virus influenza, yang membunuh lebih dari 40.000 orang yang dikenal dengan spanish flu (H1N1) (Gatherer D, 2009). Pada tahun 1957 dunia digemparkan lagi oleh wabah yang sama yang membunuh 100.000 jiwa yang dikenal sebagai Asian flu (H2N2). Sekitar 700.000 orang meninggal pada tahun 1968 karena wabah virus flu yang dikenal dengan hongkong flu (H3N2) (azuma, 2015). Jumlah kumulatif kasus konfirmasi Flu Burung di Indonesia adalah 199 kasus dengan 167 kematian (Depkes, 2015). Kasus infeksi pada manusia karena virus avian influenza H5N1 pertama kali dilaporkan di Hongkong pada tahun 1997 (WHO, 2006). WHO meningkatkan peringatan pandemik menjadi level 6 berdasarkan jumlah negara yang melaporkan kasus H1N1 2009. Virus tersebut menyebar dengan cepat di seluruh dunia dan menginfeksi manusia terutama anak-anak dan remaja (WHO, 2009).

Virus influenza termasuk dalam family *Orthomyxoviridae* yang terdiri dari virus Influenza A, Virus Influenza B, Virus Influenza C, Virus Thogoto, dan Virus Isa (Dereck, 2009). Tipe A virus influenza dibagi lagi menjadi sub tipe sesuai dengan jenis yang spesifik dan kombinasi dari dua protein yang terjadi pada permukaan virus, hemagglutinin atau "H" protein dan neuraminidase atau "N" protein (WHO, 2014). Glikoprotein ini memainkan peran penting dalam infeksi virus dan replikasi. HA protein memediasi pengikatan virion untuk reseptor asam sialat pada permukaan sel target dalam tahap awal infeksi. Setelah virus replikasi didirikan, NA memotong hubungan ikatan glikosidik asam sialat dari permukaan virus dan Sel Untuk Melepaskan virion matang dari sel yang terinfeksi (Hwang, 2015). Perubahan kecil pada antigenisitas dari virus influenza A dikenal dengan sebutan *antigenic drift* (Holmes, 2005), sedangkan perubahan besar pada antigenisitas dari suatu influenza dikenal dengan sebutan *antigenic shift* (Kamps et al., 2006).

Meskipun vaksinasi adalah pilihan terbaik untuk melindungi dari influenza infeksi virus, pendekatan ini sulit sehubungan strain burung patogenik atau reassortants manusia dengan unggas glikoprotein gen. Sampai saat ini hanya dua kelas anti-influenza obat telah disetujui; seperti amantadine dan rimantadine atau neuraminidase inhibitor seperti oseltamivir atau zanamivir. Pengobatan dengan amantadine dan turunannya hasil cepat dalam munculnya varian tahan dan tidak direkomendasikan untuk penggunaan umum dan tidak terkendali antara isolat H5N1

dari Thailand dan Vietnam 95% dari strain telah terbukti pelabuhan mutasi genetik yang terkait dengan perlawanan terhadap saluran ion M2 memblokir derivatif adamantine, amantadine dan rimantadine (Ehrhardt, 2007). Dua inhibitor NA Zanamivir (Relenza) dan Oseltamivir (Tamiflu), digunakan untuk mencegah dan mengobati infeksi influenza. Namun pengendalian infeksi virus influenza A menggunakan antivirus mulai mengalami kendala karena munculnya *strain* baru yang resisten terhadap antivirus yang sudah ada. Salah satu alternatif yang dilakukan untuk mengatasi masalah ini adalah menggunakan antivirus herbal (Pleschka *et al.*, 2009). Oleh karena itu, penemuan dan pengembangan obat baru sangat dibutuhkan untuk mengatasi keterbatasan obat saat ini, seperti efek samping yang tidak diinginkan dan munculnya strain yang resisten terhadap obat (Hwang, 2015). Tanaman memiliki sejarah evolusi yang panjang sehubungan dengan mengembangkan resistensi terhadap virus dan semakin menggambar perhatian sebagai sumber potensial untuk pengembangan obat antivirus (Sawai, 2008). Sampai saat ini sudah dilakukan beberapa penelitian yang mengisolasi senyawa flavonoid dari ekstrak daun dan buah *Vitex trifolia* (Hernandez, 1999). Pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa secara *in silico* ekstrak metanol daun *Vitex trifolia* telah terbukti menghambat pertumbuhan virus H1N1 dan bisa menurunkan *rerank score*. 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 Aaspartat *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) dan juga pada penelitian sebelumnya ekstrak metanol daun *Vitex trifolia* juga bisa menghambat pertumbuhan virus influenza A subtipe H5N1 dengan mekanisme penghambatan neuraminidase (Lestari, 2015).

Salah satu tanaman lain dari genus *Vitex* adalah *Vitex trifolia*. *Vitex trifolia* termasuk dalam famili Verbanaceae. Daunnya biasa digunakan untuk mengobati nyeri rematik, inflamasi, analgesik, antikonvulsan, dan sedatif hipnotik. Daunnya juga menunjukkan kemampuan untuk menghambat *Mycobacterium tuberculosis*. Akarnya dapat sebagai antiemetik, ekspektoran, dan tonik (Laxmikant, 2012). *Vitex trifolia* var. *simplicifolia* menunjukkan antioksidan aktivitas yang lebih kuat dan berisi signifikan fenolat (44,66 mg GAE / g) dari sayuran dan buah-buahan umum yang dianggap sebagai sumber alami yang baik dari diet antioksidan. *V. trifolia* tanaman ini berpotensi sumber antioksidan alami yang sangat baik dan antikanker (Aweng, 2012). Penelitian membuktikan kemanjuran *Vitex trifolia* terhadap bakteri patogen tertentu (Geetha, 2004). Pengembangan Potensi obat anti TBC (Tiwari, 2013). *Vitex trifolia* mempunyai aktivitas sebagai anti-HIV (Syahdi *et al*, 2012). Adanya kekerabatan yang dekat antara *Vitex trifolia* dengan *Vitex altissima* tidak menutup kemungkinan *Vitex trifolia* memiliki kemampuan sebagai antiviral

misalnya untuk virus Influenza. Golongan zat yang dimiliki oleh *Vitex altissima* dengan *Vitex trifolia* yang diduga memiliki aktivitas sebagai antivirus adalah dari golongan flavonoid. Berdasarkan penelitian yang ada, senyawa golongan flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat replikasi pertumbuhan virus dengan menghambat aktivitas neuraminidase (Liu *et al*, 2008). Golongan flavonoid didapatkan dari hasil maserasi simplisia *Vitex trifolia* dengan menggunakan pelarut etil asetat, dimana etil asetat merupakan pelarut dengan karakteristik semipolar yang secara selektif akan menarik senyawa yang bersifat semipolar seperti flavonoid (Priyanto, 2013).

Dalam melakukan suatu uji aktivitas antivirus, virus perlu ditumbuhkan pada inang yaitu pada sel atau Telur Ayam Berembrio (TAB). Maka dari itu perlu pengujian agar sampel tidak bersifat toksik pada inang. Aktivitas antivirus dapat ditunjukkan dengan penurunan nilai titer HA karena apabila suatu senyawa dapat menghambat replikasi virus maka akan terjadi penurunan titer HA (Chattopadhyay *et al.*, 2009). Uji HA memerlukan sel darah merah ayam, kalkun, manusia golongan darah O atau marmut (WHO, 2002).

1.2. Rumusan Masalah

1. Berapakah dosis aman dari fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* yang tidak menimbulkan kematian pada Telur Ayam Berembrio?
2. Apakah fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* bisa menghambat pertumbuhan virus Influenza A sub tipe H5N1 yang diinokulasikan pada Telur Ayam Berembrio?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui dosis aman fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* terhadap Telur Ayam Berembrio
2. Untuk mengetahui pengaruh fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* terhadap pertumbuhan virus Influenza A sub tipe H5N1 yang diinokulasikan pada Telur Ayam Berembrio

1.4. Manfaat Penelitian

1. Sebagai alternatif antivirus influenza A sub tipe H5N1 baru dari bahan alam yaitu daun *Vitex trifolia*

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Tanaman *Vitex trifolium*

2.1.1. Identitas Tanaman

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Bangsa : Lamiales

Suku : Verbenaceae

Marga : *Vitex*

Jenis : *Vitex trifolia* L.

Nama umum : Legundi

(Plants, USDA)



Gambar 2.1 *Vitex trifolia* (sumber : wikipedia)

2.1.2. Sinonim dan Nama Daerah *Vitex trifolia*

Sumatera : gendarasi, Legundi, Langghundi, Jawa : Lagondi, Legundi, Langghundi Nusa tenggara : Galumi, Sangari Sulawesi : dunuka, Lanra, Lawarani, rala, ai tuban (Depkes, 1989).

2.1.3. Penyebaran

Vitex trifolia adalah tanaman tropis semak belukar yang tersebar luas di negara Asia Pasifik seperti India, Sri Lanka, Cina, Filipina, Indonesia, Australia Utara, Kaledonia Baru, dan Polinesia. Selain itu telah dilaporkan bahwa *Vitex trifolia* juga berada di Afrika Timur dan banyak di pulau-pulau sekitar Pasifik dan Hawaii (Matsui, *et al*, 2009). Tanaman ini dapat biasa ditemukan di sepanjang tepi badan air seperti kanal, sungaidan kolam dan karenanya secara lokal dikenal sebagai "Neer Nochi" ("Neer" berarti air) (Tiwari, 2013).

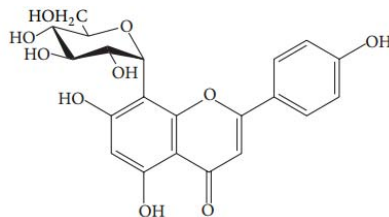
2.1.4. Morfologi *Vitex trifolia*

Pemerian bau aromatik khas rasa pahit. Makroskopik helaian daun majemuk dengan 1-3 helai anak daun 2/3 helai merupakan daun duduk atau bertangkai, umumnya tidak utuh, berwarna hijau kelabu, bentuk bundar telur, jorong, bundar telur terbalik, panjang 4-9.5 cm. Lebar 1.75- 3.75 cm. Pinggir daun rata, tangkai daun lebih kurang 5mm. Tulang daun menyirip, menonjol pada permukaan bawah. Mikroskopik pada penampang melintang

memalui tulang daun tanpa epidermis atas terdiri dari satu lapis sel terbentuk 4 persegi panjang, kutikula tipis berbintik, rambut penutup terdiri 2-3 sel berbentuk seperti tanduk, rambut kelenjar dua macam yaitu rambut kelenjar yang bertangkai pendek dengan kepala kelenjar berbentuk bulat yang terdiri dari beberapa sel dan rambut kelenjar dengan tangkai lebih panjang dengan kepala kelenjar terdiri dari dua atau lebih sel kepala, serbuk berwarna hijau kelabu frakmen pengenal adalah fragmen rambut penutup, fragmen kelenjar, fragmen epidermis atas, fragmen epidermis bawah, fragmen mesofil, fragmen pembuluh kayu, fragmen hablur Ca oksalat berbentuk rozelt (MMI, 1989).

2.1.5. Kandungan *Vitex trifolia*

kandungan kimia dari buah maupun daun legundi yaitu senyawa golongan flavonoid (kastisin; 3,6,7-trimetilkuersetagenin; vitexin; artemetin; 5-metilartemetin; 7-desmetil artemetin; luteolin; luteolin-7-O- β -D-glukuronida; luteolin-3-O- β -D-glukuronida dan isoorientin), terpenoid, maupun sterol (β -sitosterol and β -sitosterol- β -D-glukosida (Nugroho, 2005).



Gambar 2.2 Struktur molekul dari Vitexin

2.1.6. Manfaat *Vitex trifolia*

Daunnya digunakan untuk mengatasi nyeri rematik, inflamasi, analgesik, antikonvulsan, sedatif, hipnotik. Selain itu memiliki kemampuan insektisidal, sitotoksik, fungisidal. Selain itu daunnya digunakan secara internal atau eksternal ketika mandi untuk mengobati Ciguatera karena keracunan ikan. Daunnya juga berfungsi sebagai nematisidal agen dan untuk meningkatkan berat badan dan juga dilaporkan mempunyai aktivitas antitumor. Ekstrak petroleum eter dan etanol *Vitex trifolia* dapat menghambat bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Meena, 2011). Ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia*) yang merupakan bahan insektisida alami dan diduga bahwa pada daun legundi mengandung senyawa saponin, flavonoid dan alkaloid yang merupakan zat toksik bagi larva sehingga menyebabkan kematian pada larva uji. Saponin dapat menurunkan tegangan selaput mukosa traktus digestivus sehingga traktus digestivus menjadi korosif. Senyawa flavonoid mempunyai cara kerja masuk dalam tubuh larva melalui sistem pernafasan yang kemudian akan menimbulkan kelayuan pada saraf serta kerusakan pada sistem pernafasan yang menyebabkan larva tidak bisa bernafas (Cania, 2013).

2.2. Tinjauan Tentang Ekstraksi

2.2.1. Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat

larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman (Depkes, 2000).

2.2.2. Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang 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.

Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstraksi bahan baku obat secara perkolasi. Seluruh perkolat biasanya dipekatkan secara destilasi dengan pengurangan tekanan, agar bahan utama obat sesedikit mungkin terkena panas (FI V, 2015).

2.2.3. Pembuatan Ekstrak

2.2.3.1. Pembuatan Serbuk Simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering. Dari simplisia dibuat serbuk simplisia dengan permintaan tertentu sampai derajat kehalusan

tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan dasar beberapa hal berikut:

Makin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi semakin efektif-efisien, namun makin halus serbuk maka semakin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi.

Selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras (logam, dll.) maka akan timbul panas (kalor) yang dapat berpengaruh pada senyawa kandungan. Namun hal ini dapat dikompensasi dengan penggunaan nitrogen cair (Depkes, 2000).

2.2.3.2. Cairan Pelarut

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pelarut dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung (Depkes, 2000). Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan cairan adalah sebagai berikut:

- 1.) Seketivitas
- 2.) Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
- 3.) Ekonomis
- 4.) Ramah lingkungan

5.) Keamanan

Pada prinsipnya cairan pelarut harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalam perdagangan dikenal dengan kelompok spesifikasi “pharmaceutical grade”. Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan alkohol (etanol) serta campurannya. Jenis pelarut lain seperti metanol dll (alkohol turunannya), heksana dll (hidrokarbon alifatik), toluen dll (hidrokarbon aromatik), kloroform (dan segolongannya), aseton, umumnya digunakan sebagai pelarut untuk tahap separasi dan tahap pemurnian (fraksinasi). Khusus metanol dihindari penggunaannya karena sifatnya yang toksik akut dan kronik, namun demikian jika dalam uji ada sisa pelarut dalam ekstrak menunjukkan negatif, maka metanol sebenarnya pelarut yang lebih baik dari etanol (Depkes, 2000).

2.2.3.3. Pemekatan/Penguapan (Vaporasi dan evaporasi)

Pemekatan berarti meningkatkan jumlah perikel solut (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi kering, ekstrak hanya menjadi kental/pekat (Depkes, 2000).

2.2.3.4. Pengeringan Ekstrak

Pengeringan berarti menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan serbuk, masa kering-rapuh, tergantung proses dan peralatan yang digunakan. Ada berbagai proses pengeringan ekstrak yaitu dengan:

- 1.) Pengeringan Evaporasi
 - 2.) Pengeringan Vaporasi
 - 3.) Pengeringan Sublimasi
 - 4.) Pengeringan Konveksi
 - 5.) Pengeringan Kontak
 - 6.) Pengeringan Radiasi
 - 7.) Pengeringan Dielektrik
- (Depkes, 2000).

2.2.3.5. Rendemen

Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Depkes, 2000).

2.2.4. Metode Ekstraksi

2.2.4.1. Ekstraksi Dengan Menggunakan Pelarut

A . Cara Dingin

A.1. Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruang. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang terus-menerus. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan pembasahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserasi pertama dan seterusnya (Depkes, 2000).

A.2. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya, terus-menerus sampai diperoleh ekstrak yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes, 2000).

B. Cara panas

B.1. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Depkes, 2000).

B.2. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes, 2000).

B.3. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secaram umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰C (Depkes, 2000).

B.4. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur penangas air (bejana infus) tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98⁰C selama waktu tertentu (15-20 menit) (Depkes, 2000).

B.5. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (≥ 30 menit) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes, 2000).

2.2.4.2. Destilasi Uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (miyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian (Depkes, 2000).

2.2.4.3. Cara Ekstraksi Lainnya

a) Ekstraksi Bekesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan

prosesnya tersusun berurutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi jumlah pelarut (Depkes, 2000).

b) Superkritikal Karbondioksida

Penggunaan prinsip ini untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu (Depkes, 2000).

c) Ekstraksi Ultrasonik

Getaran ultrasonic (> 20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase (Depkes, 2000).

2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

2.3.1 Definisi KLT

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmail off 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*) (Adelima, 2015).

2.4 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).

2.5. Tinjauan Tentang Virus

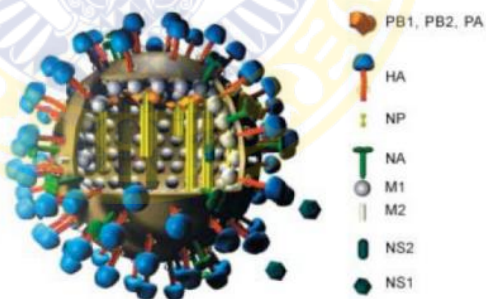
2.5.1. Virus

Virus adalah entitas nonselular yang merupakan parasit intraselular obligat. Virus memerlukan sel inang agar bisa bereproduksi. Selain itu, virus memiliki karakteristik sebagai berikut :

1. virus memiliki hanya satu jenis asam nukleat (DNA atau RNA),sedangkan sel memiliki keduanya.
2. Virus tidak memiliki sistem penyintesis protein sendiri (tidak memiliki ribosom); tidak memiliki sistem konversi energi sendiri (tidak memetabolisasi makanan untuk menghasilkan ATP)
3. Virus tidak diselubungi oleh membran lipid yang dibuatnya sendiri (walaupun sejumlah virus diselubungi suatu amplop(*envelope*) yang merupakan modifikasi membran inang saat virus meninggalkan sel). Virus tidak memiliki membran internal.
4. Virus tidak terpengaruh oleh antibiotik,walaupun sel inangnya mungkin terpengaruh.
5. Virus tidak memiliki sitoskeleton atau cara-cara untuk bergerak selain difusi.
6. Virus tidak “tumbuh ” dalam pengertian klasik,yaitu penambahan massa;dengan kata lain,begitu virus terbentuk,ukurannya tidak bertambah.

Virus yang terbentuk penuh disebut virion. Materi genetiknya terlindungi dalam selubung protein yang dikenal sabagai kapsid. Subunit-subunit protein individual yang menyusun kapsid disebut kapsomer. Unit dasar

asam nukleat dan selubung protein virus disebut nukleokapsid. Ukuran virus dalam kisaran nanometer. Yaitu sekitar 20-30 nm.virus juga tidak bisa dilihat dengan mikroskop cahaya,harus menggunakan mikroskop elektron. Genom viral berukuran lebih kecil daripada genom selular.,sehingga genom virus tidak mengkodekan banyak gen.genom viral secara khas mengkodekan gen-gen yang diperlukan bagi infeksi (contohnya enzim),replikasi genom (polimerase),produksi virion (protein kapsid),penghancuran sel inang (enzim lisozim).genom viral bisa tersusun atas DNA atau RNA,kebanyakan virus hanya memiliki satu jenis molekul asam nukleat dalam genom nya,namun juga ada yang lebih dari satu (Susan, 2007).

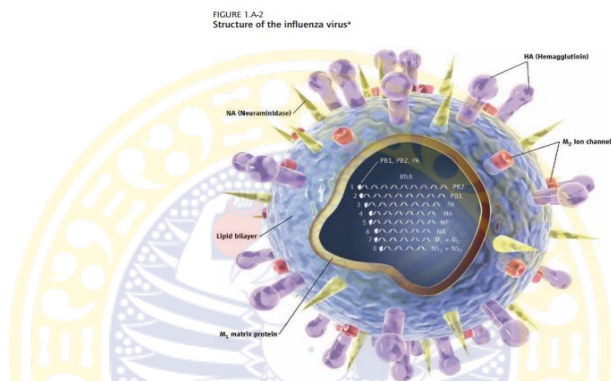


Gambar 2.3 Virus Influenza (Manual WHO, 2011).

2.5.2. Virus Influenza

Virus Influenza termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae*. Virus influenza terdiri dari 3 tipe, yaitu influenza A, B, dan C. Perbedaan ketiga tipe virus ini disebabkan adanya perbedaan pada protein HA dan NA, informasi genetik yang dikandung tiap tipe virus, dan matriks proteinnya. Genom virus influenza tipe A dan tipe B mengandung 8 segmen RNA terpisah dengan masing-masing terdiri dari 10 gen. Tipe C hanya mengandung 7 segmen RNA. Virus Influenza memiliki sebuah selubung yang tersusun atas lipid bilayer dan matriks protein. Pada bagian luar selubung ini terdapat dua jenis *spikes* yang menempel dan terbentuk dari glikoprotein. *Spikes* pertama disebut HA dan yang kedua adalah NA. HA bertanggungjawab terhadap pelekatan virus pada sel inang dan saat mulai menginfeksi sel inang. NA berperan dalam pelepasan virus baru dari sel inang, agar tidak terjadi pelekatan antar virus maupun dengan sel inang (Emmeluth, 2003) Virus avian influenza (VAI) merupakan virus influenza A terdiri atas 8 potongan RNA berpilin negatif 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 non-struktural (NS). Dari seluruh komponen yang ada, kemudian bersama-sama akan membentuk ribonukleoprotein (RNP) (garjito, 2013).



Gambar 2.4 Virus Influenza (Manual WHO, 2011)

2.5.3 Virus influenza pandemik H5N1

Pada tahun 1997, enam orang meninggal terinfeksi virus flu burung (H5N1) di HongKong, dilaporkan pertama kali infeksi fatal manusia dengan virus flu burung. pada tahun 2003, dilaporkan kasus lain yang fatal dengan virus avian H5N1. kemudian, virus H5N1 telah berevolusi melalui sering *reassortment* dan telah menyebar dari Asia ke Eropa dan Afrika, menjadi enzootik pada populasi unggas di banyak negara. Bersamaan dengan itu, infeksi pada manusia meningkat sehingga penyakit pernafasan parah dengan tingkat kematian yang tinggi;

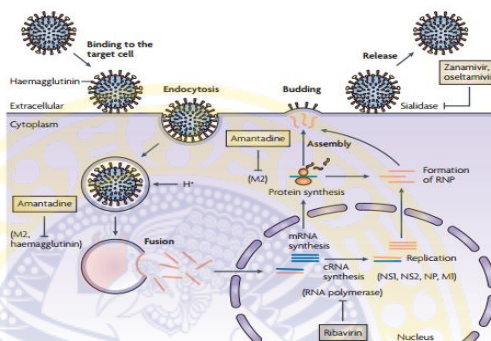
471 infeksi manusia dengan virus H5N1 telah dikonfirmasi, dengan 282 kematian (per 28 Januari 2010). Meskipun telah dilaporkan beberapa kelompok keluarga terinfeksi virus H5N1, penularan virus dari manusia ke manusia belum terjadi. Infeksi H5N1 manusia menyebabkan pneumonia berat dan limfopenia, dan ditandai oleh tingginya tingkat sitokin dan kemokin (Kawaoka, 2010).

2.5.4. Replikasi Virus Influenza

Replikasi virus influenza terdiri dari 6 tahap.

- Tahap pertama yaitu penempelan/adsorpsi virion virus influenza pada sel inang dengan bantuan protein HA.
- Tahap kedua adalah terjadinya proses endositosis. Proses tersebut berlangsung sampai semua genom RNA virus keluar dan masuk ke dalam sitoplasma.
- Tahap ketiga adalah masuknya genom RNA ke dalam inti sel (nukleus) dan terjadi transkripsi. Transkripsi dilakukan untuk mengubah polaritas RNA yang semula negatif menjadi berpolaritas positif.
- Tahap keempat adalah saat sebagian genom keluar dan masuk kembali ke dalam sitoplasma untuk mengambil *cap* RNA sel inang dan poli A, selanjutnya terjadi proses translasi yang menghasilkan protein selubung (HA dan NA).
- Tahap kelima adalah replikasi dari delapan gen RNA di dalam inti sel.

- Tahap keenam adalah kedelapan segmen RNA tersebut dibungkus dengan protein HA, NA, M, dan NS. Proses replikasi virus ini dapat berlangsung selama 6 jam sejak terjadi adsorpsi pada sel inang (Emmeluth, 2003).



Gambar 2.5 Replikasi Virus influenza (Itzstein, 2007)

2.6. Antivirus Influenza

Obat antivirus untuk mengendalikan dan mencegah influenza adalah tambahan untuk penggunaan vaksin influenza. Secara umum, empat agen antivirus influenza yang sudah mendapat ijin di berbagai negara: Amantadine, Rimantadine, zanamivir dan oseltamivir. Uji klinis telah menunjukkan bahwa keempat obat tersebut mengurangi durasi gejala bila digunakan untuk pengobatan infeksi karena influenza dan juga bisa mencegah penyakit bila digunakan untuk kemoprofilaksis. Biaya, rute administrasi, efek samping, kontraindikasi dan potensi resistensi antivirus berbeda diantara keempat obat. Berdasarkan

sifat kimia dan spektrum aktivitas terhadap virus influenza, obat dapat diklasifikasikan ke dalam dua kategori, turunan adamantine (amantadine dan rimantadine) dan neuraminidase (NA) inhibitor (zanamivir dan oseltamivir). Dari penelitian menjelaskan apabila digunakan untuk pengobatan, baik turunan adamantine (BOX 1.B-1) dan Inhibitor NA (BOX 1.B-2) efektif dalam mengurangi durasi gejala influenza A. Selain itu, studi klinis telah melaporkan bahwa inhibitor NA umumnya menghasilkan lebih sedikit efek samping yang serius (dibandingkan dengan administrasi plasebo) (WHO, 2011).

2.6.1 Tinjauan tentang Obat Antiviral

2.6.1.1 Oseltamivir

Sejarah penemuan oseltamivir ini adalah dari tanaman *Illicium verum* yang mengandung *shikimic acid*, suatu senyawa yang digunakan untuk membuat obat antivirus (Wang *et al.*, 2011).

Bentuk sediaan oseltamivir adalah kapsul (75 mg) dan suspensi (12 mg/mL). Indikasi: Infeksi influenza. Pengobatan: pengobatan untuk penyakit akut yang tidak disertai komplikasi yang disebabkan oleh infeksi influenza pada pasien yang berusia lebih dari 1 tahun yang sudah mengalami gejala tidak lebih dari 2 (dua) hari. Profilaksis : untuk profilaksis influenza pada dewasa dan anak yang lebih dari 13 tahun. Oseltamivir tidak digunakan sebagai pengganti vaksinasi. Dosis Dan Penggunaan: Oseltamivir dapat digunakan tanpa memperhatikan makanan. Jika digunakan

bersamaan dengan makanan, toleransi dapat meningkat. Pengobatan Influenza : Dewasa dan Anak lebih dari 13 tahun : dosis oral yang di rekomendasikan adalah 75 mg dua kali sehari selama 5 hari. Pengobatan dimulai setelah timbul gejala influenza dalam dua hari. Anak – anak : dosis oral suspensi yang direkomendasikan untuk anak di atas 1 tahun dan dewasa yang tidak dapat menelan kapsul adalah sebagai berikut: Dosis Suspensi Oral Oseltamivir: berat badan (kg) dosis yang direkomendasikan untuk 5 hari Volume < 15-30 mg dua kali sehari 2,5 mL (1/2 sdt). >15 - 23 45 mg dua kali sehari 3,8 mL (3/4 sdt). >23 - 40 60 mg dua kali sehari 5 mL (1 sdt). >40 75mg dua kali sehari 6,2 mL (1 1/4 sdt)

Profilaksis Influenza : dosis oseltamivir oral yang direkomendasikan untuk profilaksis influenza pada dewasa dan anak di atas 13 tahun yang telah mengalami kontak langsung dengan individu yang terinfeksi adalah 75 mg sekali sehari, sekurang-kurangnya selama 7 hari. Terapi sebaiknya dimulai setelah 2 hari terpajan. Dosis yang direkomendasikan untuk profilaksis selama terjadi wabah influenza adalah 75 mg sekali sehari.

Pengobatan influenza : penyesuaian dosis direkomendasikan untuk pasien dengan kreatinin klirens 10-30 mL/menit. Pada kondisi ini, direkomendasikan penurunan dosis menjadi 75 mg sekali sehari selama 5 hari. Profilaksis : untuk profilaksis, penyesuaian dosis direkomendasikan untuk pasien dengan kreatinin klirens 10 – 30 mL/menit. Pada kondisi ini,

direkomendasikan penurunan dosis menjadi 75 mg pada waktu tertentu.

Farmakologi : Oseltamivir adalah suatu bentuk etil ester yang memerlukan perubahan menjadi bentuk aktif oseltamivir karboksilat. Mekanisme kerja dari oseltamivir adalah inhibisi neuraminidase virus influenza yang menyebabkan perubahan agregasi dari partikel virus untuk selanjutnya menjadi bebas.

Absorpsi : oseltamivir fosfat diabsorpsi melalui saluran pencernaan setelah pemberian secara oral. Konsentrasi puncak rata-rata dari oseltamivir dan oseltamivir karboksilat adalah 65,2 ng/mL dan 348 ng/mL, setelah pemberian 75 mg, dua kali sehari. Area di bawah kurva (AUC) dari 0-12 jam adalah 112 ng/mL untuk oseltamivir dan 2719 ng/mL untuk oseltamivir karboksilat. Pemberian oseltamivir bersamaan dengan makanan tidak mempunyai efek yang signifikan terhadap konsentrasi plasma puncak dan area bawah kurva.

Distribusi : ikatan oseltamivir karboksilat terhadap protein plasma manusia adalah rendah (3%). Ikatan oseltamivir terhadap protein plasma adalah 42% artinya belum cukup mampu untuk menyebabkan pergeseran yang signifikan dalam interaksi obat.

Metabolisme : oseltamivir secara ekstensif berubah menjadi oseltamivir karboksilat melalui proses esterase yang berlangsung di liver. Baik oseltamivir maupun oseltamivir karboksilat merupakan substrat untuk atau inhibitor dari isoform sitokrom P450.

Ekskresi : oseltamivir yang diabsorpsi, secara umum (sekitar 90 %) dieliminasi melalui konversi menjadi oseltamivir karboksilat. Konsentrasi plasma oseltamivir menurun dalam waktu paruh 1-2 jam pada kebanyakan subjek percobaan setelah pemberian oral. Oseltamivir karboksilat tidak mengalami perubahan metabolisme lebih lanjut dan dieliminasi melalui urin. Konsentrasi plasma dari oseltamivir karboksilat akan menurun dalam waktu paruh 6-10 jam pada kebanyakan subjek percobaan. Oseltamivir karboksilat dieliminasi secara keseluruhan (99%) melalui ekskresi ginjal. Klirens ginjal (18,8 L/jam) melebihi kecepatan filtrasi glomerulus (7,5L/jam) menunjukkan terlibatnya sekresi tubulus, sebagai tambahan dari filtrasi glomerulus.

Kontra Indikasi: Oseltamivir dikontraindikasikan untuk pasien yang hipersensitif terhadap komponen yang ada di dalam produk.

Perhatian: *Gangguan fungsi ginjal* : penyesuaian dosis direkomendasikan untuk pasien dengan klirens kurang dari 30 mL/menit (lihat bagian dosis dan pemberian). *Kondisi menyusui* : belum diketahui apakah oseltamivir dan oseltamivir karboksilat diekskresikan ke dalam air susu. *Anak-anak* : keamanan dan efikasi oseltamivir pada anak kurang dari 1 tahun belum diketahui.

Peringatan: *Infeksi bakteri* : infeksi bakteri serius mungkin terjadi dengan gejala mirip influenza atau mungkin mengikuti atau terjadi sebagai komplikasi dari influenza. *Mulai pengobatan* : efikasi dari oseltamivir pada pasien yang mulai diobati setelah 40 jam gejala tidak diketahui. *Pasien risiko tinggi* : efikasi dari oseltamivir pada pasien dengan penyakit jantung kronis atau penyakit pernapasan

tidak diketahui. *Pencegahan influenza* : penggunaan oseltamivir seharusnya tidak mempengaruhi evaluasi dari seseorang untuk diberikan vaksinasi influenza rutin. Efikasi oseltamivir untuk penggunaan profilaksis dalam pencegahan influenza belum diketahui).

Interaksi Obat :

Probenecid penggunaan bersama oseltamivir dan probenecid akan menghasilkan peningkatan konsentrasi oseltamivir karboksilat kira-kira sebesar 2 kali karena adanya penurunan sekresi tubular anionik di ginjal.

2.6.1.2 Zanamivir

Bentuk sediaan zanamivir adalah serbuk inhalasi dalam bentuk blister 5 mg. **Indikasi:** Infeksi influenza. **Pengobatan:** pengobatan untuk penyakit akut yang tidak disertai komplikasi yang disebabkan oleh infeksi virus influenza A dan B pada pasien dewasa dan anak lebih dari 7 tahun yang sudah mengalami gejala tidak lebih dari 2 (dua) hari. Zanamivir tidak direkomendasikan untuk pasien yang mengalami penyakit kerusakan saluran pernapasan seperti asma atau penyakit kerusakan paru-paru kronik (COPD).

Dosis Dan Penggunaan: Zanamivir digunakan untuk saluran pernapasan melalui inhalasi oral dengan menggunakan alat “diskhaler” yang disertakan bersama obat. Pasien harus diberi penjelasan tentang cara penggunaan obat, jika mungkin disertai demonstrasi cara pemakaian obat. Jika zanamivir diresepkan untuk

anak-anak, pemakaiannya harus dalam pengawasan dan instruksi orang dewasa. Orang dewasa yang dimaksud disini adalah orang dewasa yang telah diberi penjelasan tentang cara pemakaian obat. Dosis zanamivir yang direkomendasikan untuk perawatan influenza pada pasien yang berusia lebih dari 7 tahun dan lebih adalah 2 inhalasi (per inhalasi adalah 5 mg blister, jadi dosis total adalah 10 mg) dua kali sehari (jarak pemakaian 12 jam), selama 5 hari. Dua dosis ini harus digunakan pada pengobatan awal, jika mungkin jarak pemberian adalah 2 jam. Pada hari berikutnya, jarak pemberian adalah 12 jam (misalnya pada malam dan siang hari), waktu pemberian ini hendaknya sama setiap hari. Tidak ada data tentang keefektifan dari pengobatan dengan zanamivir jika dimulai lebih dari dua hari setelah timbul tanda atau gejala. Pasien yang menggunakan bronkodilator bersamaan dengan zanamivir, harus menggunakan bronkodilator terlebih dahulu.

Farmakologi : Mekanisme kerja dari zanamivir adalah inhibisi neuraminidase virus influenza yang menyebabkan perubahan agregasi dari partikel virus untuk selanjutnya menjadi bebas.

Resistensi obat : virus influenza dengan kepekaan yang menurun terhadap zanamivir telah diketahui secara in vitro dengan cara melewati virus pada konsentrasi obat yang meningkat. Analisis genetik terhadap virus-virus ini menunjukkan bahwa kepekaan virus yang berkurang secara in vitro terhadap zanamivir berhubungan dengan mutasi yang menghasilkan perubahan asam amino pada neuraminidase atau hemaglutinin atau keduanya.

Resistensi silang : resistensi silang telah dipelajari antara virus influenza mutan yang resisten terhadap zanamivir dan resisten terhadap oseltamivir secara in vitro. **Absorpsi** : sekitar 4% - 17% dari dosis inhalasi akan terabsorpsi secara sistemik. Konsentrasi serum puncak bervariasi antara 17 – 42 mg/mL, dalam 1-2 jam setelah pemberian dosis 10 mg.

Distribusi : zanamivir memiliki ikatan terhadap protein plasma yang sangat terbatas (kurang dari 10%). **Metabolisme** : zanamivir diekskresi melalui ginjal dalam bentuk yang tidak berubah. Tidak ada metabolit yang terdeteksi. **Ekskresi** : waktu paruh dari zanamivir setelah pemberian melalui inhalasi oral bervariasi antara 2,5 -5,1 jam. Zanamivir akan diekskresi dalam bentuk yang tidak berubah dalam urin dengan ekskresi dari dosis tunggal utuh dalam waktu 24 jam. Total klirens adalah 2,5 – 10,9 L/jam. Obat yang tidak diabsorpsi akan diekskresi melalui feces.

Kontra Indikasi: Zanamivir dikontraindikasikan untuk pasien yang hipersensitif terhadap komponen yang ada di dalam produk. **Perhatian**: *Pasien dengan penyakit pernapasan* : Zanamivir tidak menunjukkan efektif dan mungkin berisiko untuk pasien dengan penyakit saluran pernapasan parah seperti asma dan penyakit pernapasan serius lainnya. Dengan demikian, zanamivir tidak direkomendasikan untuk pasien dengan gangguan saluran pernapasan seperti asma. *Kehamilan* : Kategori C. Tidak ada penelitian yang cukup atau terkontrol dengan baik pada wanita hamil. Penggunaan saat hamil hanya jika manfaat lebih besar daripada risikonya. *Kondisi menyusui* : belum diketahui apakah

zanamivir diekskresikan ke air susu. Harus disertai perhatian jika memberikan zanamivir untuk pasien yang menyusui. *Anak-anak* : keamanan dan efikasi zanamivir pada anak kurang dari 7 tahun belum diketahui.

Peringatan: Mulai pengobatan : tidak ada data untuk mendukung keamanan dan efikasi pada pasien yang memulai pengobatan setelah 48 jam timbulnya gejala. *Serangan berulang* : keamanan dan efikasi dari penggunaan untuk serangan berulang belum diketahui. *Reaksi alergi* : reaksi seperti alergi, termasuk edema oropharyngeal dan gangguan kulit serius telah diketahui dari hasil penelitian *post marketing* zanamivir. Penggunaan zanamivir harus dihentikan dan dimulai pengobatan yang sesuai jika dicurigai akan terjadi reaksi alergi. *Infeksi bakteri* : infeksi bakteri serius mungkin terjadi dengan gejala mirip influenza atau mungkin mengikuti atau terjadi sebagai komplikasi dari influenza. Zanamivir tidak diketahui dapat mencegah komplikasi-komplikasi ini.

Interaksi Obat: Zanamivir bukan merupakan substrat dan tidak mempengaruhi isoenzim sitokrom P450 (CYP) : CYP1A1/2, 2A6, 2C9, 2C18, 2D6, 2E1, dan 3A4) pada mikrosom liver manusia.

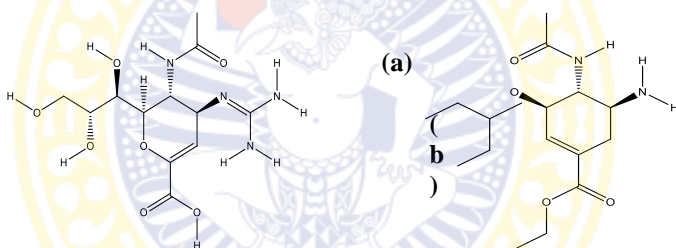
Efek Samping : Efek samping yang terjadi pada sekitar 3 % pasien adalah diare, gangguan hidung, mual, sinusitis, infeksi telinga, hidung dan tenggorokan. Hasil laboratorium : terjadi peningkatan enzim liver, CPK, limfopenia, neutropenia. Hasil yang diperoleh antara pemberian zanamivir dan placebo menunjukkan hasil yang mirip (Depkes,2007).

2.6.1.3 Amantadine dan Rimantadin

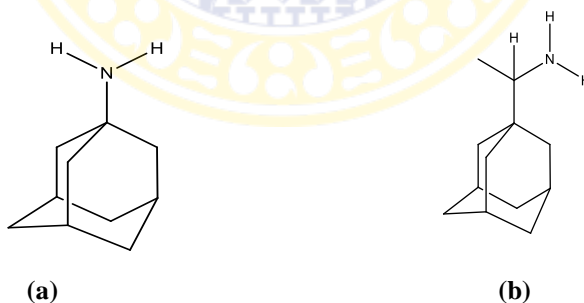
Amantadine dan Rimantadin mempunyai mekanisme kerja yang sama. Efikasi keduanya terbatas pada influenza A saja. Mekanisme Kerja : Amantadine dan Rimantadin merupakan antivirus yang bekerja pada protein M2 virus, suatu kanal ion transmembran yang diaktivasi oleh pH. Kanal M2 merupakan pintu masuk ion 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 ≤ 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 edisi V).



Gambar 2.6 Struktur molekul Zanamivir (a) dan Oseltamivir (b)



Gambar 2.7 Struktur molekul Amantadine (a) dan Rimantadine

2.7. Uji Antivirus Influenza

2.7.1. Uji Hemaglutinin (HA)

Uji HA merupakan uji yang paling banyak digunakan untuk pengamatan dan untuk menentukan karakteristik antigen suatu isolat virus influenza. Uji hemaglutinin ini digunakan untuk mengidentifikasi isolasi influenza dengan protein HA mengikat sel darah merah (RBC) yang mengakibatkan mereka aglutinasi. Ketika suatu antibodi dapat berikatan dengan protein HA maka tidak akan terjadi aglutinasi sel darah merah oleh virus influenza. Penghambatan protein HA tersebut yang menjadi dasar pengujian ini. Nilai titer HA adalah pengenceran tertinggi dari virus yang masih memperlihatkan hemaglutinasi sempurna. Titer hemaglutinasi bertentangan dengan dilusinya. Sebagai contoh jika sebuah virus menyebabkan aglutinasi sempurna sampai dilusi 1:256, berarti titer HANYA adalah 256 (WHO, 2011).

2.8. Neuraminidase

Neuraminidase berperan di dalam spesifisitas VAI terhadap hospes, yaitu berperan untuk menghidrolisis ikatan antara galaktosa dan *N-acetylneraminic* pada rantai ujung oligosakarida-glikoprotein. Fungsi NA ini harus berada dalam posisi seimbang dengan HA. Kondisi ini bertujuan agar aktivitas enzimatik dalam melepaskan *Sialic acid* dari sel yang terinfeksi tidak menyebabkan penurunan efisiensi infeksi sel berikutnya. Fungsi lain dari NA adalah untuk melepaskan partikel virus yang sudah selesai bereplikasi di dalam sel, efisiensi replikasi VAI

sangat tergantung pada kerjasama protein HA dan NA dari virus. Apabila ada 2 atau lebih strain VAI menginfeksi suatu sel secara bersama-sama, akan sangat dimungkinkan terjadinya pengacakan segmen virus (*genetic reassortment*), termasuk gen penyandi NA dan HA, yang akan berakibat munculnya strain baru dengan kombinasi genom yang baru dan spesifisitas hospes yang berbeda dengan virus asalnya (garijito, 2013).



BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL

Virus influenza termasuk dalam family *Orthomyxoviridae* yang terdiri dari virus Influenza A, Virus Influenza B, Virus Influenza C, Virus Thogoto, dan Virus Isa (Dereck, 2009). Tipe A virus influenza dibagi lagi menjadi subtipe sesuai dengan jenis yang spesifik dan kombinasi dari dua protein yang terjadi pada permukaan virus, hemagglutinin atau "H" protein dan neuraminidase atau "N" protein (WHO, 2014).

Beberapa tahun terakhir ini perhatian dunia kesehatan terpusat kepada semakin merebaknya penularan avian influenza A (H5N1). Meningkatnya kasus infeksi H5N1 yang menyebabkan kematian pada manusia sangat diawatirkan dapat berkembang menjadi wabah pandemi yang berbahaya bagi umat manusia (Radji M, 2006). Diawali pada tahun 1918 dunia digemparkan dengan adanya wabah pandemi yang disebabkan oleh virus influenza, yang membunuh lebih dari 40.000 orang yang dikenal dengan spanish flu (H1N1) (Gatherer D, 2009). Pada tahun 1957 dunia digemparkan lagi oleh wabah yang sama yang membunuh 100.000 jiwa yang dikenal sebagai Asian flu (H2N2). Sekitar 700.000 orang meninggal pada tahun 1968 karena wabah virus flu yang dikenal dengan hongkong flu (H3N2) (Azuma, 2015). Kasus infeksi pada manusia karena virus avian influenza H5N1 pertama kali dilaporkan di Hongkong pada tahun 1997 (WHO, 2006). WHO

meningkatkan peringatan pandemik menjadi level 6 berdasarkan jumlah negara yang melaporkan kasus H1N1 2009. Virus tersebut menyebar dengan cepat di seluruh dunia dan menginfeksi manusia terutama anak-anak dan remaja (WHO, 2009).

Dua inhibitor NA Zanamivir (Relenza) dan Oseltamivir (Tamiflu), digunakan untuk mencegah dan mengobati infeksi influenza. Namun, penggunaan jangka panjang obat ini dapat menyebabkan munculnya dan penyebaran resistan terhadap obat mutan; apalagi, penggunaan obat ini juga dibatasi oleh mereka toksisitas yang tinggi. Oleh karena itu, penemuan dan pengembangan obat baru sangat dibutuhkan untuk mengatasi keterbatasan obat saat ini, seperti efek samping yang tidak diinginkan dan munculnya strain yang resistan terhadap obat (Hwang, 2015). Untuk vaksinasi dianjurkan untuk orang-orang yang berisiko tertular virus influenza dan tidak alergi terhadap komponen vaksin (Emmeluth, 2003). Suatu vaksin yang efektif terhadap virus influenza A (H5N1) membutuhkan waktu berbulan-bulan sebelum vaksin siap untuk digunakan pada wabah pandemi atau hanya tersedia dengan jumlah yang terbatas. Selama rentang waktu tersebut, obat anti virus influenza akan dibutuhkan untuk mengatasi tahapan awal tersebut, terapi terhadap individu yang terinfeksi dan juga sebagai terapi profilaksis (hurt *et al.*, 2006).

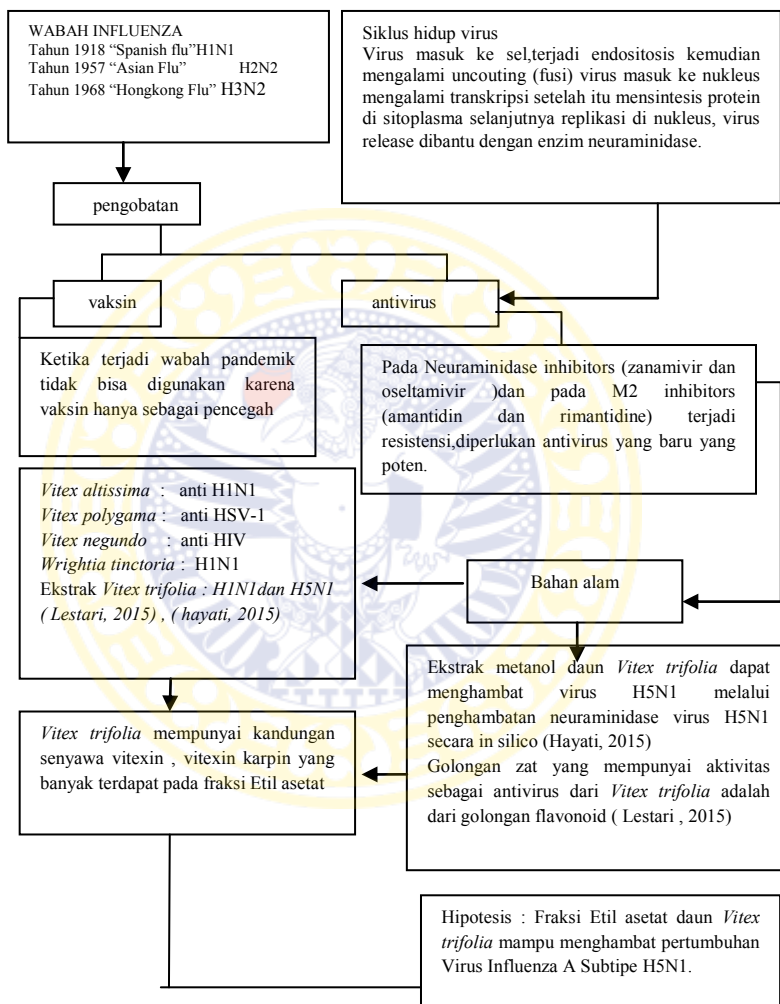
Banyak senyawa aktif fitokimia seperti flavonoid, terpenoid, telah ditemukan mempunyai efek terapeutik terhadap virus. Aktivitas antivirus terhadap influenza H1N1 dipelajari menggunakan tanaman obat dari etnis India Selatan. Hasil

penelitian menunjukkan bahwa *Wrightia tinctoria* (2,25 lg / ml) adalah salah satu penghambat terbaik terhadap virus H1N1. Aktivitas antivirus yang dimiliki menunjukkan bahwa tanaman ini dapat digunakan sebagai kapsul herbal untuk virus H1N1. *Wrightia tinctoria* dan *Sarracenia minor* menunjukkan indeks terapeutik yang tinggi menunjukkan bahwa mereka tanaman dapat digunakan untuk pengembangan obat anti-virus. Temuan dari negara penelitian ini bahwa tanaman *Wrightia tinctoria* sumber potensial untuk pengembangan obat anti-virus generasi ketiga terhadap H1N1. Salah satu tanaman lain dari genus Vitex adalah *Vitex trifolia*. *Vitex trifolia* termasuk dalam famili Verbanaceae. Daunnya biasa digunakan untuk mengobati nyeri rematik, inflamasi, analgesik, antikonvulsan, dan sedatif hipnotik. Daunnya juga menunjukkan kemampuan untuk menghambat *Mycobacterium tuberculosis*. Akarnya dapat sebagai antiemetik, ekspektoran, dan tonik (Laxmikant, 2012). *Vitex trifolia* menunjukkan antioksidan aktivitas yang lebih kuat dan berisi signifikan fenolat (44,66 mg GAE / g) dari sayuran dan buah-buahan umum yang dianggap sebagai sumber alami yang baik dari diet antioksidan. *Vitex trifolia* berpotensi sumber antioksidan alami yang sangat baik dan antikanker (Aweng, 2012). Penelitian membuktikan kemanjuran *Vitex trifolia* terhadap bakteri patogen tertentu (Geetha, 2004). Pengembangan Potensi obat anti TBC (Tiwari, 2013). *Vitex trifolia* mempunyai aktivitas sebagai anti-HIV (Syahdi *et al.*, 2012). Adanya kekerabatan yang dekat antara *Vitex trifolia* dengan *Vitex*

altissima dan *Vitex polygama* tidak menutup kemungkinan *Vitex trifolia* memiliki kemampuan sebagai antiviral virus Influenza.

Golongan flavonoid didapatkan dari hasil maserasi simplisia *Vitex trifolia* dengan menggunakan pelarut etil asetat, dimana etil asetat merupakan pelarut dengan karakteristik semipolar yang secara selektif akan menarik senyawa yang bersifat semipolar seperti flavonoid (Priyanto, 2013). Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa ekstrak metanol daun *Vitex trifolia* dapat menghambat virus H5N1 melalui mekanisme penghambatan neuraminidase virus H5N1 (Lestari, 2015) dari penelitian lain membuktikan bahwa 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).

PENGARUH FRAKSI FLAVONOID DAUN *Vitex trifolia* TERHADAP VIRUS INFLUENZA A SUBTIPE H5N1



Gambar 3.1 Pengaruh fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* Terhadap Virus Influenza A subtipe H5N1

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Variabel Penelitian

4.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang menjadi penyebab utama pokok permasalahan. Jika ada perubahan pada variabel bebas, mengakibatkan perubahan pada variabel tergantung (Zainuddin, 2011).

Variabel bebas : Fraksi Flavonoid daun *Vitex trifolia*.

4.1.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah variabel menunjukkan akibat dengan adanya variabel sebab. Jenis dan besarnya akan berubah tergantung pada perubahan jenis dan besaran variabel bebas (Zainuddin, 2011).

Variabel Tergantung : Titer virus influenza A Subtipe H5N1.

4.1.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang sepanjang penelitian berlangsung dibuat sedemikian rupa sehingga konstan atau ada dalam kondisi yang sama (Zainuddin, 2011).

Variabel kontrol : Jenis virus influenza, RBC, PBS, DMSO, TAB.

4.2. Bahan

4.2.1. Sampel

Bahan uji yang digunakan adalah fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia*. Daun ini didapatkan dari Unit Pelaksana Teknis (UPT) Materia Medica di Kota Batu.

4.2.2. Virus dan Media Pengujian

Virus yang digunakan adalah virus influenza A H5N1 yang diambil dari Laboratorium *Avian Influenza Research Center* BSL-3 Universitas Airlangga. Virus ditumbuhkan pada TAB yang dibeli dari PUSVETMA.

4.2.3. Bahan Kimia

N-heksana, Etilasetat, Etanol, metanol, kloroform, Steril Water for Irrigation USP, silica gel, silica gel GF60, Tablet Phosphate Buffered Saline (PBS) dari GIBCO, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Red Blood Cell (RBC), RBCayam, Penicilin streptomycin solution (Pen Strep) dari SIGMA.

4.3. Alat

Timbangan analitik, corong buchner, Rotary Evaporator, Lemari Pendingin 4⁰C, Alat gelas, Kertas saring, silica gel GF₂₅₄, kromatografi kolom vakum, Gunting logam, ChemBioDraw Ultra 12.0, *Software*. Multivhannel Micro Pipet, Micro Pipet, "V" shaped 96 well Tissue Culture Plate, candler, conical, spuit injeksi.

4.4. Prosedur Kerja

4.4.1. Pembuatan Ekstrak daun *Vitex trifolia*

Daun *Vitex trifolia* yang baru dipetik, dibersihkan kemudian ditimbang berat basah nya. Setelah itu dikeringkan dibawah bayangan sinar matahari sampai kering kurang lebih 5-7 hari. Selama pengeringan daun tidak boleh terkena sinar matahari langsung. Setelah kering kemudian ditimbang berat kering dari daun. Daun yang sudah kering kemudian di giling sampai menjadi serbuk. Setelah itu serbuk ditimbang. Kemudian Serbuk di letakkan di dalam toples dan di rendam (macerasi) dengan metanol sebanyak 3x dari berat ekstrak. Serbuk di rendam selama tiga hari dan setiap hari serbuk di saring dengan corong Buchner dan kertas saring. Kemudian diberi metanol lagi, seterusnya hingga hari ketiga. Larutan yang didapat kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Setelah kental, ekstrak ditimbang dan disimpan dalam wadah di lemari pendingin.

4.4.2. Pembuatan Fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia*

Ekstrak kental metanol daun *Vitex trifolia* ditimbang, kemudian ekstrak ditambahkan dengan air sama banyak. Selanjutnya masukkan dalam corong pisah, setelah itu siapkan n-heksan dengan volume sama banyak dan masukkan ke dalam corong pisah. Kocok dengan corong pisah hingga terpisah antara fraksi air dan fraksi n-heksana . Tampung fraksi n-heksana, ulangi proses diatas sampai fraksi air tidak berwarna gelap. Pada proses ini didapatkan fraksi n-heksana. Kemudian

fraksi air ditambahkan dengan etil asetat dengan volume sama banyak. Kocok dengan corong pisah hingga terpisah antara fraksi air dengan fraksi etil asetat. Dalam proses ini didapatkan fraksi etil asetat. Langkah ini diulangi hingga fraksi air tidak berwarna gelap. Fraksi yang didapat kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Setelah kental, fraksi ditimbang dan disimpan dalam wadah di lemari pendingin.

4.4.3 Kromatografi kolom vakum dari fraksi Etil asetat daun *Vitex trifolia*

Ditimbang sebanyak 32 gram silica gel GF 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 10% dari jumlah silica gel yang digunakan. Silica Kristal ditimbang sama banyak dngan fraksi, fraksi dan silica Kristal dicampur dengan tujuan agar tersalutkan. Ditambah silica kristal satu lapis diatas fraksi dimasukkan dalam kolom vakum dan dinyalakan.

- a) Ditambahkan kloroform 100 ml, dinyalakan vakum dan ditampung tetesan kloroform sampai habis
- b) Ditambahkan Kloroform : etil asetat (9:1 = 90: 10ml) dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis, (Masukkan wadah)

- c) Ditambahkan Kloroform : etil asetat (8:2 = 80: 20ml)
dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis,
(Masukkan wadah)
- d) Ditambahkan Kloroform : etil asetat (7:3 = 70: 30ml)
dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis,
(Masukkan wadah)
- e) Ditambahkan Kloroform : etil asetat (6:4 = 60: 40ml)
dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis,
(Masukkan wadah)
- f) Ditambahkan Kloroform : etil asetat (5:5= 50: 50ml)
dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis,
(Masukkan wadah)
- g) Ditambahkan Kloroform : etil asetat (4:6 = 40: 60ml)
dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis,
(Masukkan wadah)
- h) Ditambahkan Kloroform : etil asetat (3:7= 30: 70ml)
dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis,
(Masukkan wadah)
- i) Ditambahkan Kloroform : etil asetat (2:8= 20: 80ml)
dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis,
(Masukkan wadah)
- j) Ditambahkan Kloroform : etil asetat (1:9= 10: 90ml)
dinyalakan vakum dan ditampung sampai habis,
(Masukkan wadah)
- k) 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. Subfraksi yang menunjukkan spot atau noda flavonoid terbanyak akan diambil untuk diuji.

4.4.4. Pembuatan Larutan Phosphate Buffered Saline (PBS)

Tablet PBS, sebanyak 4 tablet, setiap 2 tablet dilarutkan dalam 1 L *water for irrigation* dalam botol kaca dan akan diperoleh cairan PBS 0,01 M dengan pH 7,2. Selanjutnya ditutup, tetapi tidak terlalu rapat, dilapisi aluminium foil dan kemudian disterilisasi dengan otoklaf selama 20 menit pada suhu 171° C. Larutan ini kemudian disimpan dalam pendingin dengan suhu 4° C.

4.4.5. Pembuatan Larutan Induk fraksi flavonoid 5000 ppm

Pembuatan larutan induk fraksi dengan melarutkan 50,0 mg 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.

4.4.6. Pengenceran Berseri Larutan Induk Fraksi flavonoid 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 fraksi larutan yang dipakai untuk uji dari pengenceran berseri ini adalah 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan 125 ppm.

4.4.7. Menentukan Dosis Aman Dari Fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia*

Menentukan dosis aman dari fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* menggunakan Telur Ayam Berembrio (TAB) yang berusia 9-11 hari. Bersihkan TAB yang sudah berumur 9-11 hari dengan menggunakan alkohol 70 %. Setelah itu telur tersebut di candling dan dilihat apakah embrio di dalam telur tersebut masih ada pergerakan atau tidak. Kemudian TAB diberi tanda batas dengan menggunakan pensil dengan bantuan egg candler. Pembuatan tanda pada telur untuk lubang tidak boleh dekat dengan pembuluh darah dan embrio, karena nantinya akan berefek pada telur, efeknya yaitu telur akan mati. Jarak pembuatan lubang $\pm 3-5$ mm dari batas ruang udara. TAB yang sudah diberi tadi dilubangi dengan alat pelubang steril.

Dengan lima konsentrasi ekstrak yang telah dibuat, tiap konsentrasi diambil sebanyak 0,1 ml + 0,05 ml larutan pen strep. Tiap konsentrasi kemudian diinokulasikan ke dalam TAB, masing-masing konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Setelah memasukan ekstrak + larutan pen strep, lubang yang ada pada telur ditutup dengan solatip hingga benar-benar rapat. TAB di inkubasikan pada incubator 37⁰C 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 4⁰C. Setelah 2 hari TAB yang tidak mati dipindahkan ke lemari pendingin dengan suhu 4⁰C selama semalam (WHO, 2011). Dari proses tersebut bisa ditentukan konsentrasi mana yang akan digunakan untuk uji aktivitas.

4.4.8. Inokulasi Pada TAB

Bersihkan TAB yang sudah berumur 9-11 hari dengan menggunakan alkohol 70 %. Setelah itu telur tersebut di *candling* dan dilihat apakah embrio di dalam telur tersebut masih ada pergerakan atau tidak. Kemudian TAB diberi tanda batas dengan menggunakan pensil dengan bantuan *egg candler*. Pembuatan tanda pada telur untuk lubang tidak boleh dekat dengan pembuluh darah dan embrio, karena nantinya akan berefek pada telur, efeknya yaitu telur akan mati. Jarak pembuatan lubang $\pm 3-5$ mm dari batas ruang udara. TAB yang sudah diberi tadi dilubangi dengan alat pelubang steril.

Untuk membuat kontrol positif, Zanamivir sebanyak 100 μ L diinokulasikan selama 2 jam di satu TAB kemudian disuntikkan virus H5N1 sebanyak 100 μ L. Untuk membuat kontrol negatif, virus H1N1 diinokulasikan ke dalam satu TAB sebanyak 100 μ L. Setelah itu fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* sebanyak 100 μ L diinokulasikan selama 2 jam setelah itu disuntikkan virus H5N1 sebanyak 100 μ L dengan jumlah telur sesuai dengan

konsentrasi yang ditentukan berdasarkan uji toksisitas. Masing-masing konsentrasi yang sudah ditentukan dari uji toksisitas dilakukan 3 replikasi, telur setelah dinokulasikan lubangnya ditutup dengan solatip. TAB di inkubasikan pada inkubator 37⁰C selama 2 hari. Setiap hari telur diamati dan *dicandling* embrionya. Embrio yang mati sebelum tiga hari, dikeluarkan dari inkubator kemudian disimpan di lemari pendingin dengan suhu 4⁰C. Setelah 2 hari TAB yang tidak mati dipindahkan ke lemari pendingin dengan suhu 4⁰C selama semalam. Setelah itu diambil cairan *allantois* untuk diuji titer hemaglutininnya (WHO, 2011).



Gambar 4.1. Inokulasi pada TAB (Yuniar, 2015)

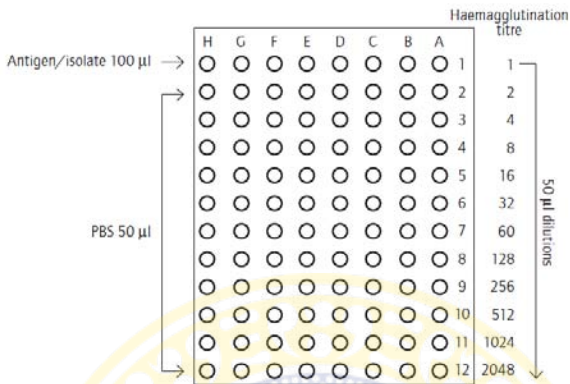
4.4.9. Panen Virus

Setelah telur didinginkan dengan suhu 4⁰C selama semalam. Menyiapkan tabung sentrifuge (15 mL) sejumlah telur. Bersihkan telur dengan menggunakan alkohol 70%. Dengan menggunakan gunting steril, gunting cangkang telur bagian atas, yang sebelumnya tadi sudah digambari, gunting kemudian

singkirkan membran allantoisnya dan jangan sampai merusak pembuluh darah telur tersebut. Kemudian dengan menggunakan spuit 10 mL, cairan allantois diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge yang sebelumnya tabung sudah diberi label. Masukkan cairan allantois ke dalam tabung terpisah, karena cairan allantois diperoleh dari berbagai telur. Selanjutnya setelah cairan allantois diambil, kemudian di sentrifuge pada 3000 rpm selama 5 menit, perlakuan sama pada semua telur (WHO, 2011).

4.4.10. Tes Hemaglutinasi (Uji HA)

Menyiapkan 96-well plate kemudian 50 μ L PBS dimasukkan ke sumuran plate 2-12 dari setiap baris yaitu A2-A12; B2-B12; sampai H2-H12. Kemudian ditambahkan cairan allantois sebanyak 50 μ L dikolom A1-H11 selanjutnya dibuat pengenceran serial dengan mengambil 50 μ L cairan allantois dari sumuran A ke H, setelah itu pada sumuran terakhir dibuang 50 μ L. Kemudian dihomogenkan dengan cara plate diketuk, kemudian plate ditutup dengan plastik pembungkus, selanjutnya diinkubasi di lemari pendingin pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama satu jam, kemudian cek setiap 30 menit. Setelah satu jam, plate dilihat apakah terjadi aglutinasi atau tidak. selanjutnya dianalisis untuk dihitung titernya.



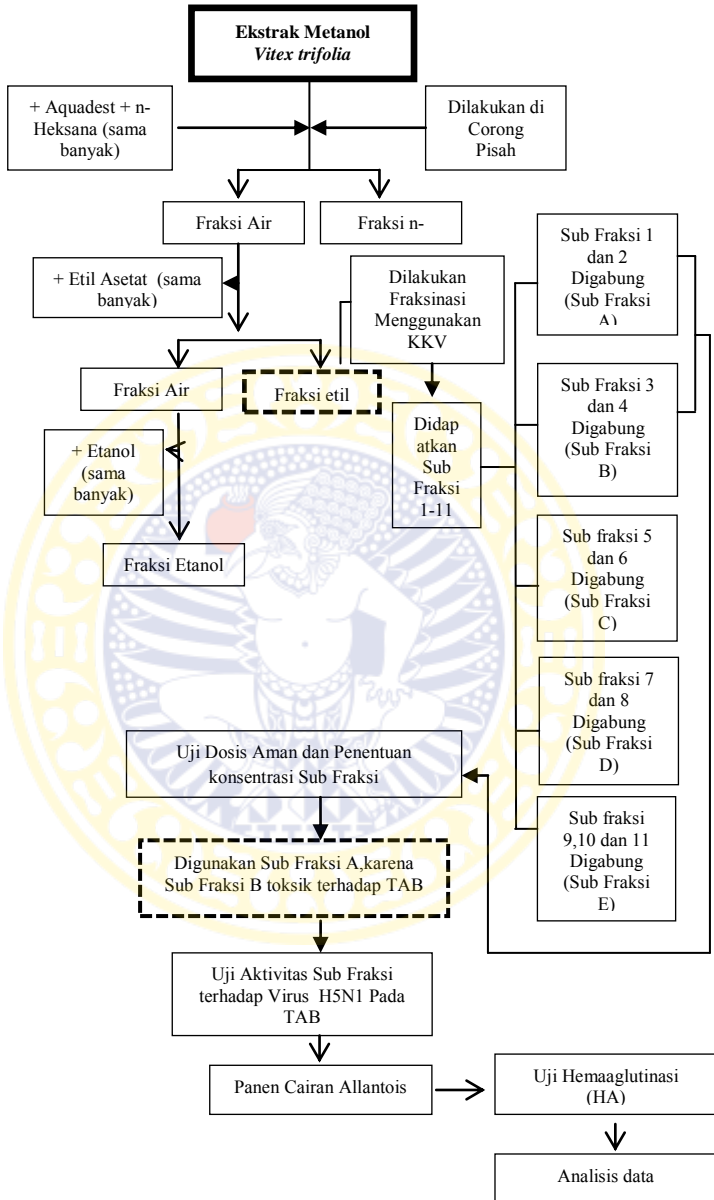
Gambar 4.2 well plate-96 (WHO, 2011)

4.4.10.1. Analisis Data Uji HA

Hasil uji HA adalah titer HA dari masing-masing perlakuan. Kemudian titer HA tersebut akan dibandingkan dengan titer HA pada kontrol virus. Dibuat persentase penurunan titer HA, hal ini akan menunjukkan kemampuan sampel uji dalam menghambat virus.

$$\text{Persentase hambatan aktivitas antiviral} = \frac{\text{titer HA tanpa perlakuan} - \text{titer HA dengan perlakuan}}{\text{titer HA tanpa perlakuan}} \times 100\%$$

(untari,at al 2012)



Gambar 4.3 Kerangka konseptual

BAB V HASIL PENELITIAN

5.1 Pembuatan Fraksi dan Fraksi Flavonoid daun *Vitex trifolia*

Pelarut : etil asetat, n-heksana, aquadest
Bahan : ekstrak metanol daun *Vitex trifolia*
Suhu *rotary evaporator* : 50° C
Tekanan *rotary evaporator* : 100-200 mbar

Pembuatan Fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Tahap awal dalam pembuatan fraksi ini adalah dengan dilakukan proses fraksinasi dengan mengencerkan ekstrak metanol dengan aquadest sama banyak, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi berturut-turut dari pelarut n-heksana, dan etil asetat. Mula-mula difraksinasi dengan menggunakan pelarut n heksana sama banyak. Diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi air. Fraksi n-heksana dipisahkan, kemudian fraksi air difraksinasi dengan etil asetat sama banyak, diperoleh fraksi flavonoid dan fraksi air. Setiap fraksi dilakukan hingga fraksi air bening. Kemudian hasil dari masing-masing fraksi n-heksana, dan etil asetat dikumpulkan. Hasil fraksinasi ini dipekatkan dengan menggunakan rotari evaporator. Kemudian fraksi flavonoid dilakukan pemisahan senyawa dengan menggunakan metode kromatografi vakum cair. Pembuatan Fraksi flavonoid diawali dengan penimbangan 32 gram silica gel 60 G *for thin-layer chromatography*. Diratakan

pada kolom cepat dengan ditekan pelan-pelan hingga ketinggian silica $\frac{3}{4}$ dari tinggi kolom sambil dinyalakan vakum. Dimasukkan kloroform sebanyak 100 ml dan vakum dalam keadaan menyala. Ditampung tetesan kloroform sampai habis. Ditimbang fraksi flavonoid daun *vitex trifolia* 3.2 gram. Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) *for column chromatography* ditimbang sama banyak dengan fraksi flavonoid. Ditambah silica gel satu lapis diatas fraksi dimasukkan dalam kolom vakum dan dinyalakan. Kemudian dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* pada masing-masing sub fraksi

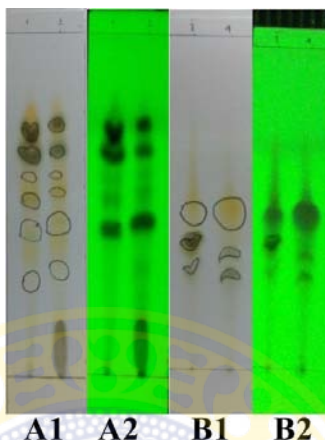
Tabel 5.1 Kode subFraksi dan Perbandingannya

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

Selanjutnya fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* yang diperoleh dipakai untuk melakukan uji toksisitas terhadap Telur Ayam Berembrio (TAB) dan uji aktivitas terhadap virus influenza A sub tipe H5N1.

5.2. Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis.

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



Gambar 5.1 Pemisahan Sub Fraksi 1,2,3 dan 4 menggunakan eluen Kloroform : Etil Asetat

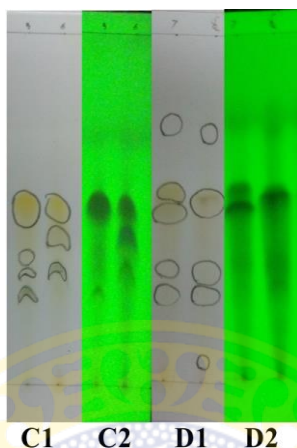
Keterangan Gambar 5.1 :

A. Pemisahan Sub Fraksi 1 dan 2 menggunakan fase gerak eluen Kloroform : Etil Asetat (9:1v/v) dan menggunakan fase diam Plat KLT

1. **A1.** Gambar Sub fraksi 1 dan 2 dengan Penampak Noda Uap Amonia
2. **A2.** Gambar Sub fraksi 1 dan 2 dengan Sinar UV 254 nm

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

1. **B1.** Gambar Sub fraksi 3 dan 4 dengan Penampak Noda Amonia
2. **B2.** Gambar Sub fraksi 3 dan 4 dengan Sinar UV 254nm



Gambar 5.2 Pemisahan Sub Fraksi 5,6,7 dan 8 menggunakan eluen Kloroform : Etil Asetat

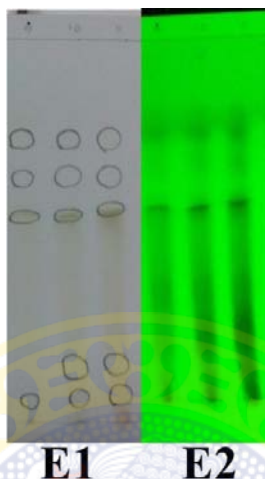
Keterangan Gambar 5.2 :

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

1. **C1.** Gambar Sub fraksi 5 dan 6 dengan Penampak Noda Uap Amonia
2. **C2.** Gambar Sub fraksi 5 dan 6 dengan Sinar UV 254nm

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

1. **D1.** Gambar Sub fraksi 7 dan 8 dengan Penampak Noda Uap Amonia
2. **D2** Gambar sub fraksi 7 dan 8 dengan sinar UV 254nm



Gambar 5.3 Pemisahan Sub Fraksi 9, 10 dan 11 menggunakan eluen Kloroform : Etil Asetat

Keterangan Gambar 5.3 :

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

1. **E1.** Gambar Sub fraksi 9, 10 dan 11 dengan Penampak Noda Uap Amonia
2. **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, yang selanjutnya disebut fraksi A dan fraksi B.

5.3 Hasil Uji dosis aman Pada Telur Ayam Berembrio (TAB)

Larutan fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* diinokulasikan ke dalam 3 TAB untuk semua konsentrasi. Mulai dari konsentrasi 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, dan 2000 ppm. Setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu 37°C. Apabila terjadi kematian pada TAB, dipindahkan kedalam lemari pendingin dengan suhu 4°C selama 24 jam.

Tabel 5.2 Hasil uji dosis aman fraksi A daun *Vitex trifolia* pada TAB

Perlakuan 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	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Keterangan: (+) : Embrio Hidup (-) : Embrio Mati 1,2,3 : Replikasi									

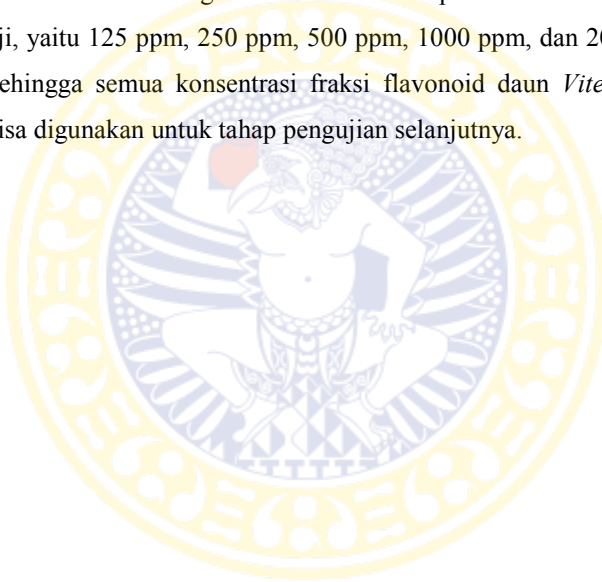
Tabel 5.3 Hasil uji dosis aman fraksi B daun *Vitex trifolia* pada TAB

Perlakuan 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	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Keterangan:									
(+) 1,2,3 : Embrio Hidup									
(-) 1,2,3 : Embrio Mati									
1,2,3 : Replikasi									

Berdasarkan uji dosis aman tersebut, pada waktu inkubasi 72 jam ada beberapa embrio yang mati pada konsentrasi 250 ppm dan 1000 ppm pada fraksi A masing-masing satu yang mati. Sedangkan untuk fraksi B ada beberapa embrio yang mati pada konsentrasi 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, dan 2000 ppm. Jumlah embrio yang mati pada fraksi B lebih banyak dibandingkan dengan

fraksi A. Oleh karena itu fraksi flavonoid yang dipakai yaitu fraksi A .

Pada fraksi A kematian TAB hanya terjadi pada konsentrasi 250 pada replikasi ke tiga dan pada konsentrasi 1000 ppm pada replikasi ke tiga dalam inkubasi 72 jam,hal ini menunjukkan bahwa fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* tidak toksik dan aman digunakan untuk TAB pada semua konsentrasi uji, yaitu 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, dan 2000 ppm. Sehingga semua konsentrasi fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* bisa digunakan untuk tahap pengujian selanjutnya.



5.4 Hasil Uji Aktivitas antivirus H5N1 pada TAB

Pada uji ini, 21 TAB yang berusia 11 hari diberi perlakuan seperti berikut

Tabel 5.4 Pengamatan pada TAB setelah injeksi virus influenza A subtype H5N1 dan fraksi A daun *Vitex trifolia*

Perlakuan	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	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Kontrol Negatif	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Kontrol Positif	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Pada tabel pengamatan diatas bisa dilihat, ada beberapa telur dengan konsentrasi yang berbeda tidak bisa bertahan hingga 72 jam. TAB yang mati kemudian dimasukkan kedalam lemari pendingin 4°C. TAB kemudian dipanen untuk diambil cairan *allantois*. Cairan *allantois* kemudian diuji HA

Cairan *allantois* hasil dari panen TAB kemudian diuji hemaglutinasinya dengan menggunakan RBC(*Red Blood Cell*)

ayam 0,5 % dalam PBS pada 96-well plate “v”. Pengamatan dilakukan setelah 30 menit. Hasil yang positif adalah ketika terjadi endapan di dasar well plate dan hasil negatif ketika tidak terjadi endapan di dasar well plate. Uji HA dilakukan pada semua sampel dan replikasi, selain itu juga dilakukan uji HA pada kontrol negatif virus H5N1 dan kontrol positif. Hasil dari uji HA adalah sebagai berikut

Tabel 5.5 Hasil uji HA pada uji aktivitas terhadap virus influenza A sub tipe H5N1

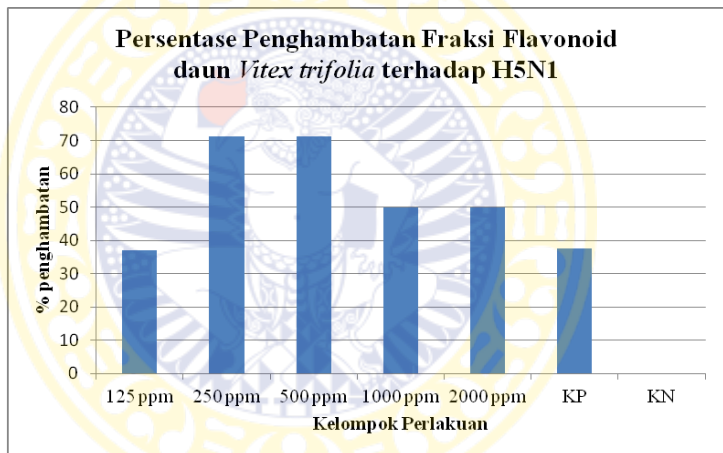
Perlakuan	Titer HA (HAU) TAB ke-			Rerata Titer HA	Rerata Titer HA ($^2 \log 2$)	% pengha mbatan
	1	2	3			
125 ppm	2 ³	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁵	5	37,5
250 ppm	2 ⁰	2 ³	2 ⁴	2 ^{2,3}	2,3	71,25
500 ppm	2 ⁴	2 ¹	2 ²	2 ^{2,3}	2,3	71,25
1000 ppm	2 ³	2 ⁰	2 ⁹	2 ⁴	4	50
2000 ppm	2 ⁵	2 ¹	2 ⁶	2 ⁴	4	50
Kontrol negatif	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	8	-
Kontrol positif	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁵	5	37,5

Pada TAB perlakuan 125 ppm persen penghambatan sebesar 37,5 %, pada perlakuan 250 ppm dan 500 ppm persen penghambatan meningkat sebesar 71,25 %, sedangkan pada perlakuan 1000 ppm dan 2000 ppm persen penghambatan mengalami penurunan dan stagnan yaitu sebesar 50 %.

Dari tabel diatas rerata titer HA pada perlakuan 125 ppm sebesar 2⁵, pada angka 5 menunjukkan bahwa pada pengenceran ke-5 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. Pada perlakuan 250 ppm dan 500 ppm terjadi peningkatan titer HA sebesar $2^{2,3}$, dan pada perlakuan 1000 ppm dan 2000 ppm titer HA sebesar 2^4 .

Gambar 5.4 Grafik persentase penghambatan fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* terhadap virus H5N1



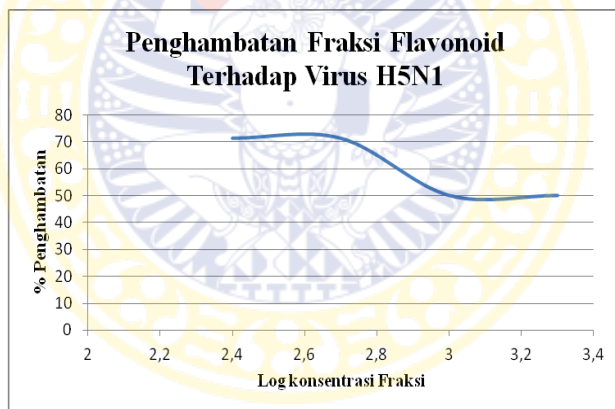
5.5 Penentuan IC50 fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* terhadap Virus H5N1

Setelah diperoleh persentase penghambatan masing-masing konsentrasi fraksi flavonoid, kemudian dibuat grafik logaritma konsentrasi fraksi terhadap persentase penghambatan

virus, sehingga dapat diketahui IC50 fraksi terhadap virus H5N1 yaitu pada konsentrasi 1000 ppm dan 2000 ppm.

Tabel 5.6 Log konsentrasi fraksi flavonoid dan persen penghambatan

Konsentrasi fraksi flavonoid (ppm)	Log konsentrasi fraksi flavonoid (x)	% penghambatan (y)
250	2.40	71.25
500	2.70	71.25
1000	3	50
2000	3.30	50



Gambar 5.5 Grafik penghambatan fraksi Flavonoid terhadap Virus H5N1

BAB VI PEMBAHASAN

Influenza adalah penyakit infeksi yang menyerang terutama organisme eukariotik tingkat tinggi dan disebabkan oleh virus influenza yang termasuk dalam family *Orthomyxoviridae* yang terdiri dari virus influenza A, virus influenza B, virus influenza C, virus Thogoto dan virus Isa . Virus influenza A adalah virus RNA dimana virus ini berpotensi untuk mengalami mutasi dengan kecepatan yang tinggi, berupa *antigenic drift* maupun *antigenic shift* (Lestari, 2015). Penemuan dan pengembangan obat baru sangat dibutuhkan untuk mengatasi keterbatasan obat saat ini, seperti efek samping yang tidak diinginkan dan munculnya strain yang resistan terhadap obat (Hwang, 2015). Salah satu alternatif yang dilakukan untuk mengatasi masalah ini adalah menggunakan antivirus herbal. Antivirus herbal mampu memberikan penghambatan yang luas terhadap beberapa *strain* virus sekaligus, karena kemampuannya dalam menginaktivasi langsung maupun menghambat satu atau lebih tahap-tahap penting replikasi virus. Selain itu, antivirus herbal sering menunjukkan berbagai macam bioaktivitas (Pleschka *et al.*, 2009). Sejarah dari penemuan oseltamivir adalah dari tanaman *Illicium verum* yang mengandung shikimic acid, yaitu suatu senyawa yang digunakan dalam pembuatan obat antivirus (Wang *et al.*, 2011). Luteolin dan vitexin memiliki aktivitas penghambatan terhadap rotavirus. Senyawa

tersebut juga terdapat pada tanaman *Vitex trifolia* (Knipping *et al.*, 2012)

Pada penelitian ini menggunakan ekstrak metanol daun legundi yang diperoleh dari penelitian sebelumnya. Ekstrak metanol masih terdapat berbagai kelompok senyawa metabolit sekunder sehingga perlu dilakukan pemisahan senyawa melalui proses fraksinasi. Penggunaan pelarut yang berbeda tingkat kepolaran mempengaruhi jenis senyawa yang terekstrak (Firdausi *et al.*, 2015). Dari ekstrak metanol dilakukan proses fraksinasi dengan mengencerkan ekstrak metanol dengan aquadest sama banyak, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi berturut-turut dari pelarut n-heksana, untuk menarik senyawa non polar yang tidak diinginkan. Kemudian dilanjutkan dengan etil asetat dimana etil asetat merupakan pelarut dengan karakteristik semi polar yang secara selektif akan menarik senyawa yang bersifat semi polar seperti flavonoid dan etanol 96 %. Mula-mula difraksinasi dengan menggunakan pelarut n heksana sama banyak. Diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi air. Fraksi n-heksana dipisahkan, kemudian fraksi air difraksinasi dengan etil asetat sama banyak, diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi etil asetat dipisahkan, fraksi air difraksinasi dengan etanol 96% sama banyak, diperoleh fraksi etanol 96%. Setiap fraksi dilakukan hingga fraksi air bening. Kemudian hasil dari masing-masing fraksi n-heksana, etil asetat dan etanol 96% dikumpulkan. Hasil fraksinasi ini dipekatkan dengan menggunakan rotari evaporator. Kemudian fraksi etil asetat dilakukan pemisahan senyawa dengan

menggunakan metode kromatografi vakum cair . Dasar pemilihan fraksi etil asetat yaitu pada fraksi etil asetat menunjukkan noda kuning intensif daripada fraksi n-heksana dan fraksi etanol 96%.

Kromatografi vakum cair merupakan salah satu kromatografi vakum khusus yang biasanya juga menggunakan silikia gel sebagai adsorben. Pada KVC, kolom dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan adsorben maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang paling non polar yang akan dipakai dituang ke permukaan adsorben kemudian divakum lagi. Kelebihan kromatografi vakum cair, fraksi-fraksi yang ditampung biasanya bervolume jauh lebih besar dibandingkan dengan fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom biasa. Langkah pemisahan menggunakan kromatografi vakum cair biasanya dilakukan pada tahap awal pemisahan (Muntasiroh, 2010). Kemudian dilakukan pemisahan senyawa flavonoid dari sub fraksi untuk mendapatkan spot noda terbaik menggunakan eluen kloroform : etil asetat dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Didapat sub fraksi terbaik campuran eluen kloroform:etilasetat (100:0 dan 90:10) . Pengujian adanya flavonoid menggunakan metode KLT dengan diberi uap amoniak. (Ramadhani, 2013). Sub fraksi yang digunakan dalam dosis aman yaitu gabungan dari fraksi 1 dan 2 serta gabungan dari fraksi 3 dan fraksi 4. Yang selanjutnya disebut sub fraksi A dan sub fraksi B.

Untuk mengetahui pengaruh fraksi terhadap telur ayam berembrio (TAB) sebagai media pertumbuhan virus, dilakukan uji dosis aman fraksi A dan fraksi B daun *Vitex trifolia* pada TAB

dalam berbagai konsentrasi, yaitu 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, dan 2000 ppm. Pemilihan konsentrasi dalam penelitian tersebut tidak ada batasan khusus. Waktu inkubasi yang digunakan untuk uji toksisitas adalah selama 72 jam, dimana pengamatan dilakukan tiap 24 jam untuk melihat apakah ada TAB yang mati setelah diinokulasikan dengan fraksi uji. Berdasarkan uji dosis aman yang dilakukan pada konsentrasi tersebut, fraksi A yang digunakan tidak toksik terhadap TAB (tidak menimbulkan kematian pada embrio) namun pada fraksi B menimbulkan kematian pada beberapa replikasi TAB, sehingga bisa disimpulkan fraksi B bersifat toksik. Konsentrasi yang digunakan untuk uji aktivitas adalah 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, dan 2000 ppm.

Sebanyak 21 TAB diinokulasi dengan menggunakan virus dan ekstrak kemudian diinkubasi selama 72 jam. Pengamatan terhadap kematian embrio dilakukan setiap 24 jam. Setelah selesai masa inkubasi, cairan *allantois* dipanen dan dilakukan uji HA untuk mengetahui titer virus. Uji HA untuk virus H5N1 digunakan 0,5% *Red Blood Cell* (RBC) ayam dalam PBS menggunakan 96 *wall plate V bottom*. Larutan fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* dengan hambatan paling kecil yaitu pada konsentrasi 125 ppm yaitu 37 %. Sedangkan hambatan tertinggi pada 250 ppm dan 500 ppm sebesar 71,25 %, setelah dosis dinaikkan menjadi 1000 ppm dan 2000 ppm hambatannya turun dan stagnan.

Sebelumnya telah dilakukan penelitian bahwa ekstrak metanol daun *Vitex trifolia* bisa menghambat pertumbuhan virus

H5N1 melalui penghambatan neuraminidase, penghambatan hemaaglutinasi, dan penentuan IC50 pada virus H5N1. Pada pengujian hemaaglutinasi ekstrak metanol daun *Vitex trifolia* memberikan prosentase penghambatan sebesar 66.67 % pada dosis 1000 ppm. Pada penelitian sebelumnya juga telah dilakukan pengujian neuraminidase, hasil uji HA mendukung hasil uji NA karena ekstrak metanol bisa menghambatan enzim neuraminidase sebesar 67.31 % pada konsentrasi 250 ppm (Lestari., 2015). Dari hasil tersebut bisa disimpulkan bahwa prosentase penghambatan pada fraksi A lebih besar dari pada ekstrak metanol. Prosentase penghambatan pada fraksi A sebesar 71.25 % pada dosis 250 ppm sedangkan prosentase penghambatan pada ekstrak metanol sebesar 66.67 % pada dosis 1000 ppm. Hal ini disebabkan karena fraksi yang digunakan lebih mengerucut pada senyawa aktifnya yaitu flavonoid.

Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi A daun *vitex trifolia* memiliki aktivitas antivirus terhadap virus influenza A sub tipe H5N1 (Chattopadhyay *et al.*, 2009) dan meskipun dosis dinaikkan, penghambatan akan virus ini tetap. Karena fraksi A daun *vitex trifolia* memiliki aktivitas antivirus terhadap virus influenza A sub tipe H5N1, diperlukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan isolasi untuk mengetahui senyawa aktif yang berperan penting dalam proses tersebut, penelitian secara *in vivo* menggunakan hewan uji seperti *ferret*, serta pengujian aktivitas antivirus dari *Vitex trifolia* terhadap virus influenza A sub tipe yang lain.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan, dapat diambil kesimpulan:

1. Fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* tidak menimbulkan toksisitas terhadap telur ayam berembrio (TAB) hingga konsentrasi 2000 ppm.
2. Fraksi flavonoid daun *Vitex trifolia* memiliki aktivitas antivirus H5N1 dengan mekanisme menurunkan titer HA.

7.2 Saran

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme kerja dan senyawa yang memiliki aktivitas antivirus terhadap virus influenza A subtipe H5N1 pada daun *Vitex trifolia* penelitian secara *in vivo* menggunakan hewan uji seperti *ferret*, serta pengujian aktivitas antivirus dari *Vitex trifolia* terhadap virus influenza A subtipe yang lain.
2. *Vitex trifolia* sebagai kandidat antivirus yang baru dapat diuji aktivitas penghambatannya terhadap virus influenza yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung Endro Nugroho¹ dan Gemini Alam.2007. *Review Tanaman Obat Legundi*. Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; Jurusan Farmasi,Fakultas MIPA Universitas Hasanudin Makassar.
- Ajay Kumar Meena,U. S. Niranjana, M. M. Rao ,M. M. Padhi, Ramesh Babu.2011. *A review of the important chemical constituents and medicinal uses of Vitex genus*.
- Aweng E.R.1, Nur Hanisah1, Mohd Nawi M.A.1, Nurhanan Murni Y.2 and Shamsul M.1 Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of *Vitex Trifolia* Var, *ISCA Journal of Biological Sciences* Vol. 1(3), 65-68, July (2012)*Simplicifolia* Associated with Anticancer.
- Chattopadhyay, D., Sarkar, M.C., Chatterjee, T., Dey, R.S., Bag, P., Chakraborti, S., Khan, M.T.H. (2009) Recent Advacements for The Evaluation of Antiviral Activities of Natural Products. *New Biotechnology* Vol. 25 Number 5.
- Departemen Kesehatan RI.2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan.
- Derek Gatherer.2009. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *Journal of Clinical Virology* 45 (2009) 174–178.
- Elrod Susan .2007.*Genetika edisi keempat*.copyright 2002 by the McGraw-Hill companies.Translation copyright 2007 by Penerbit Erlangga.
- Emmeluth, Donald. (2003) *Deadly Diseases and Epidemics Influenza*. New York: Chelsea House Publishers.

- Erhardt, et al. 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* 7(2007) 38–47.
- 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).
- Hayati, Arina., 2015. *Pengaruh Ekstrak Daun Vitex Trifolia Terhadap Pertumbuhan Virus Influenza A Subtipe H1N1 Pandemi 2009*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.
- Hendayana, S., 2006. *Kimia Pemisahan*. Bandung: Penerbit Remaja Rosda Karya.
- Hwang, et al. 2015. Anti-influenza activities of polyphenols from the medicinal mushroom *Phellinus baumii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25 (2015) 3256–3260
- Laxmikant, Kulkarni. (2012) *Vitex trifolia linn (Verbenaceae): A Review on Pharmacological and Biological Effects, Isolated and Known Potential Phytoconstituents of Therapeutic Importance*. *Int. J. Res. Pharm. Sci*, 3 (3), 441-445.
- Lestari, Widyaphiana, I.P., 2015. *Aktifitas ekstrak Daun Vitex trifolia sebagai antivirus H5N1 (Flu Burung)*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya
- Maksum Radji. 2006. Avian influenza A (H5N1) patogenesis, pencegahan dan penyebaran pada manusia. *Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. III, No.2*, Agustus 2006, 55 – 65 (ISSN : 1693-9883).

- Muchid, Abdul, dkk. 2007. *Pharmaceutical care untuk pasien Flu Burung*. Direktorat bina farmasi komunitas dan klinik ditjen bina kefarmasian dan alat kesehatan departemen kesehatan.
- Muntasiroh al qoshash.2010. isolasi dan identifikasi komponen kimia fraksi teraktif buah merah (*pandanus conoideus* lam.) hasil uji toksisitas secara brine shrimp lethality test. Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- M.M.Herna´ndez a,C.Heraso a, M.L. Villarreal a,b, I. Vargas-Arispuro c,E. Aranda.1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *Journal ofEthnopharmacology* 67 (1999) 37–44.
- Neerja Tiwaria, Jayprakash Thakurb, Dharmendra Saikiab, Madan M. Guptaa. *Phytomedicine* 20 (2013) Antitubercular diterpenoids from *Vitex trifoli* 605– 610.
- Pleschka, S., Stein, M., Schoop, R., Hudson J.B., 2009. Anti-viral properties and mode of action of standardized *Echinacea purpurea* extract against highly pathogenic avian Influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). *Virology Journal*. 6: 197.
- 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.
- Reiko Sawai,Kazumichi Kurodab Toshikatsu Shibata Rieko Gomyoub,Kenji Osawaa Kazufumi Shimizu.2008. Anti-influenza

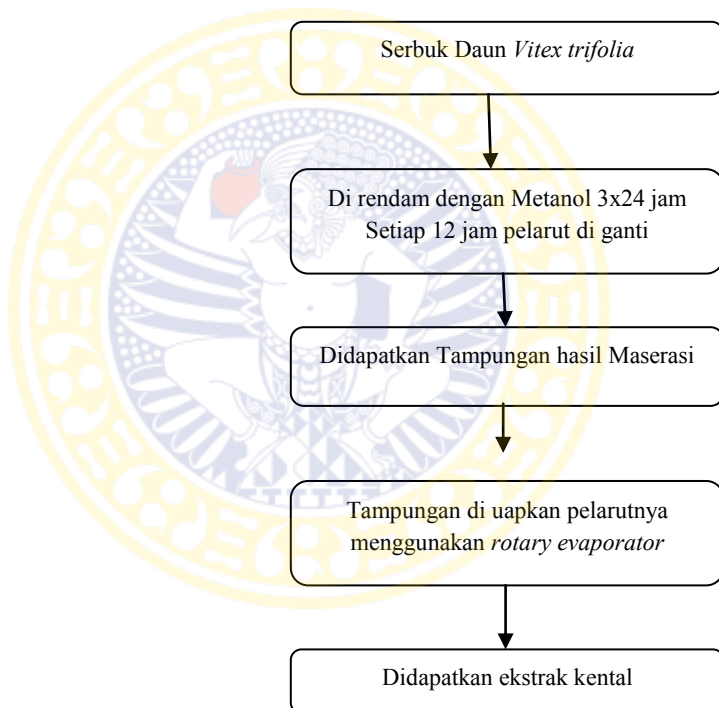
- virus activity of *Chaenomeles sinensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 118 (2008) 108–112.
- Rezi Riadhi Syahdi1, Abdul Mun'im1, Heru Suhartanto2 & Arry Yanuar1.2012. Virtual screening of Indonesian herbal database as HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. Volume 8(24).
- Syarif, Amir .,dkk.2012.Farmakologi dan terapi. Departemen farmakologi dan terapeutik fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Edisi V. Halaman 646.
- Taisuke Horimoto and Yoshihiro Kawaoka. 2010.Pandemic Influenza. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, 2010, Volume 2.
- Takashi Azuma, Norihide Nakada, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka.2015. Prediction, risk and control of anti-influenza drugs in the Yodo RiverBasin, Japan during seasonal and pandemic influenza using the transmission model for infectious disease. *Science of the Total Environment* 521–522 (2015) 68–74
- Triwibowo Ambar Garjito.2013.Virus Avian Influenza H5n1 : Biologi Molekuler Dan Potensi Penularannya Ke Unggas Danmanusia.Artikel.Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP).
- 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
- V.Geetha , A.Doss And A.Pichai Anthoni Doss.2004. *Antimicrobial Potential Of Vitex Trifolia Linn. Vol : XXIII (4)* April, May, June – 2004

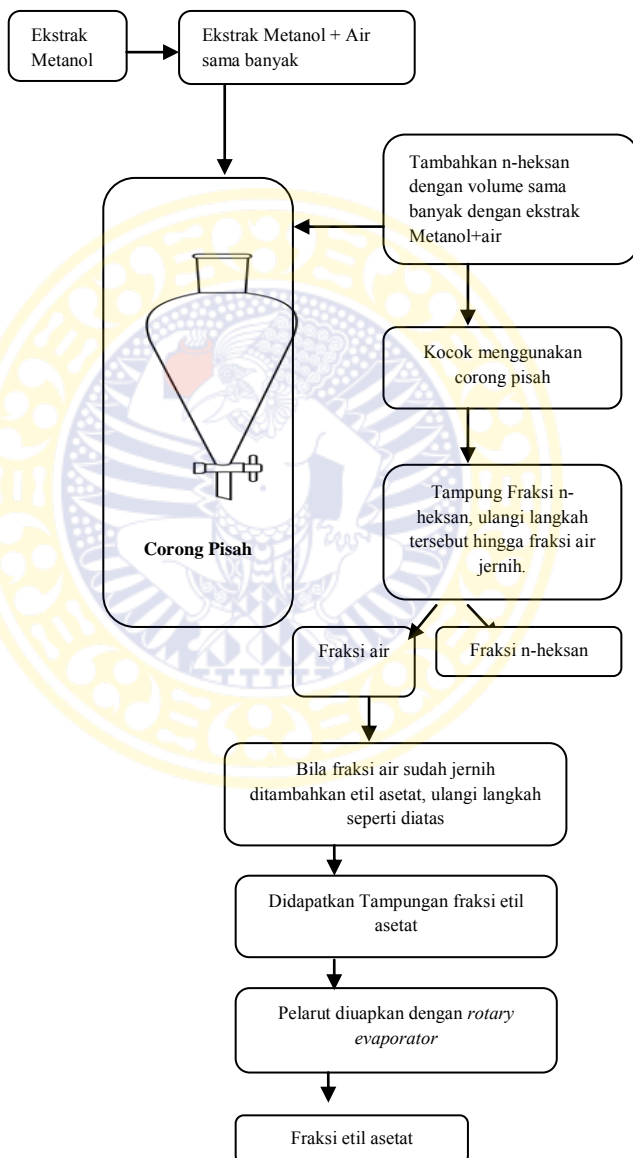
- World Health Organisation.2002.WHO Animal Influenza Manual. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. Avenue Appia: WHO press
- World Health Organisation. 2014. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness
- World Health Organisation. 2011. *Manual for The Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza*. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Zainudin, Muhammad. 2014. Metodologi Penelitian Kefarmasian dan Kesehatan. Airlangga University Press Kampus C unair Surabaya. Halaman 39-40.
- (:<http://www.depkes.go.id/article/view/15042800001/mai-dan-ts-positif-flu-burung.html#sthash.gi41xHDY.dpuf>) diakses pada tanggal 12 Desember 2015
- 003-2014.

LAMPIRAN

Lampiran 1

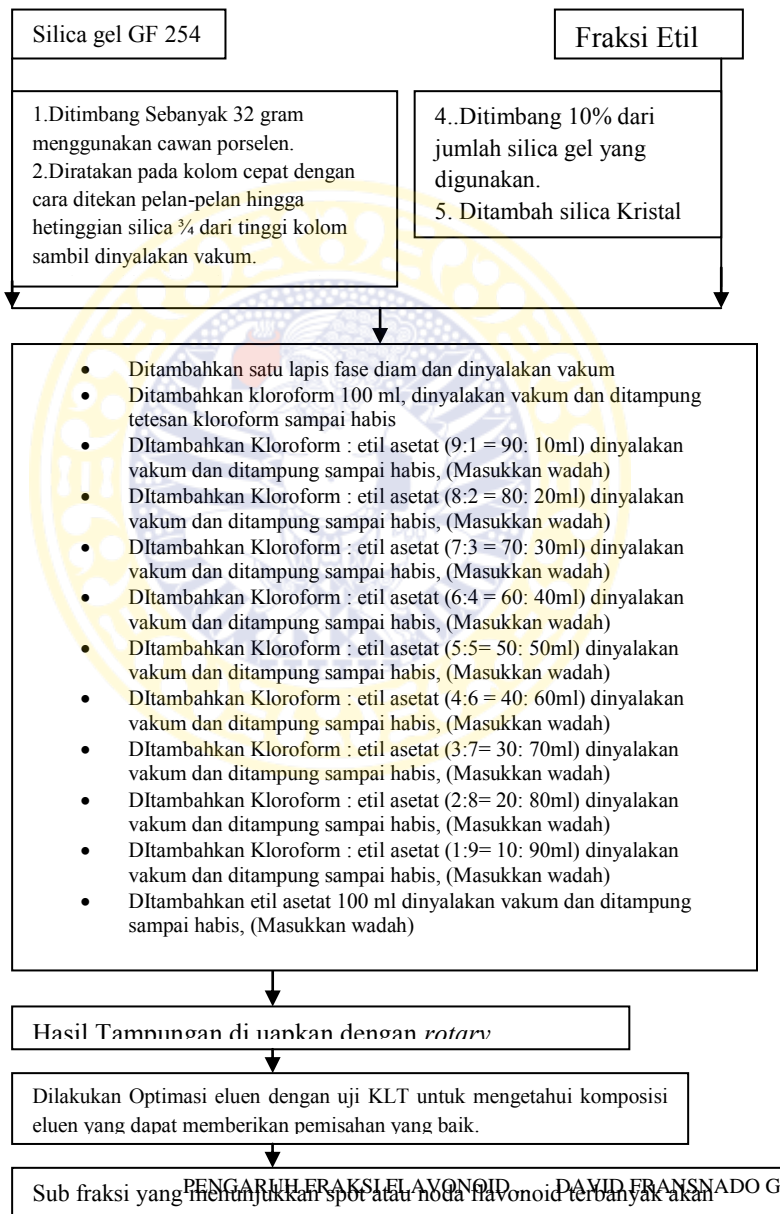
Skema Prosedur Pembuatan Ekstrak Metanol



Lampiran 2**Skema Prosedur Fraksinasi Daun *Vitex trifolia*.**

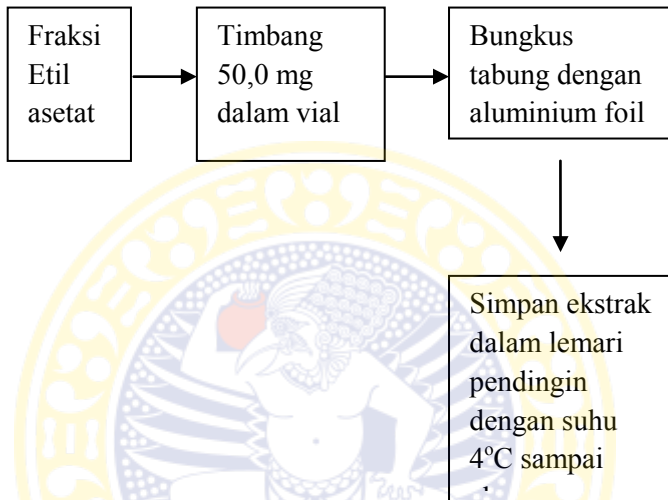
Lampiran 3

Skema Prosedur Kromatografi Kolom Vakum Fraksi Etil Asetat



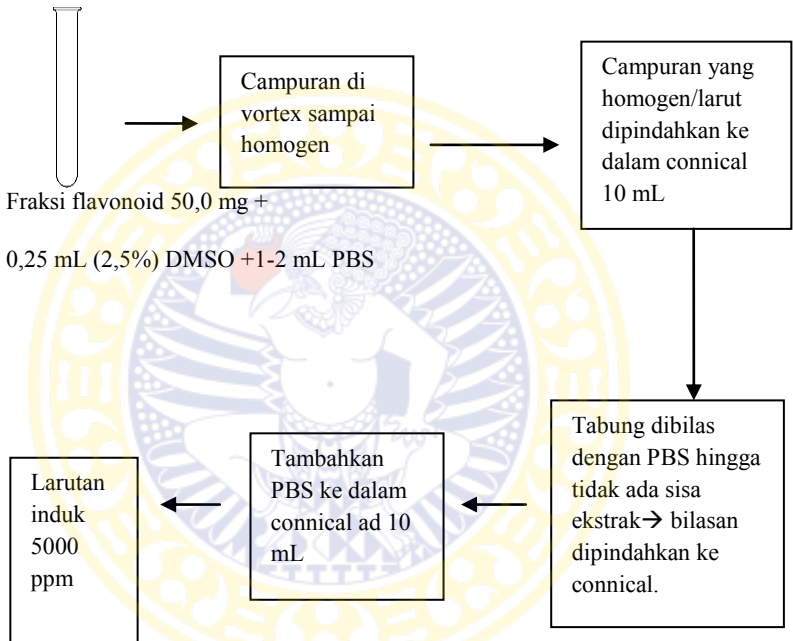
Lampiran 4

Skema prosedur kerja penimbangan Fraksi flavonoid



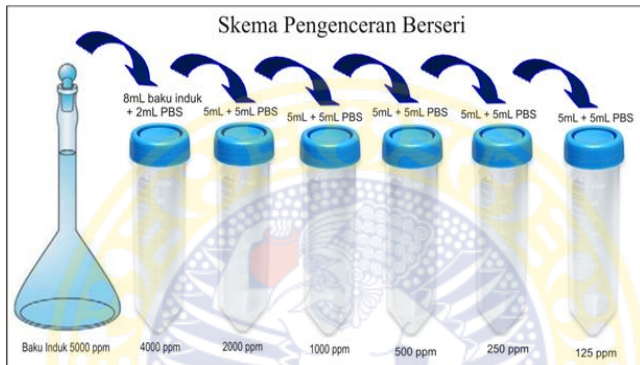
Lampiran 5

Skema prosedur kerja pembuatan larutan induk



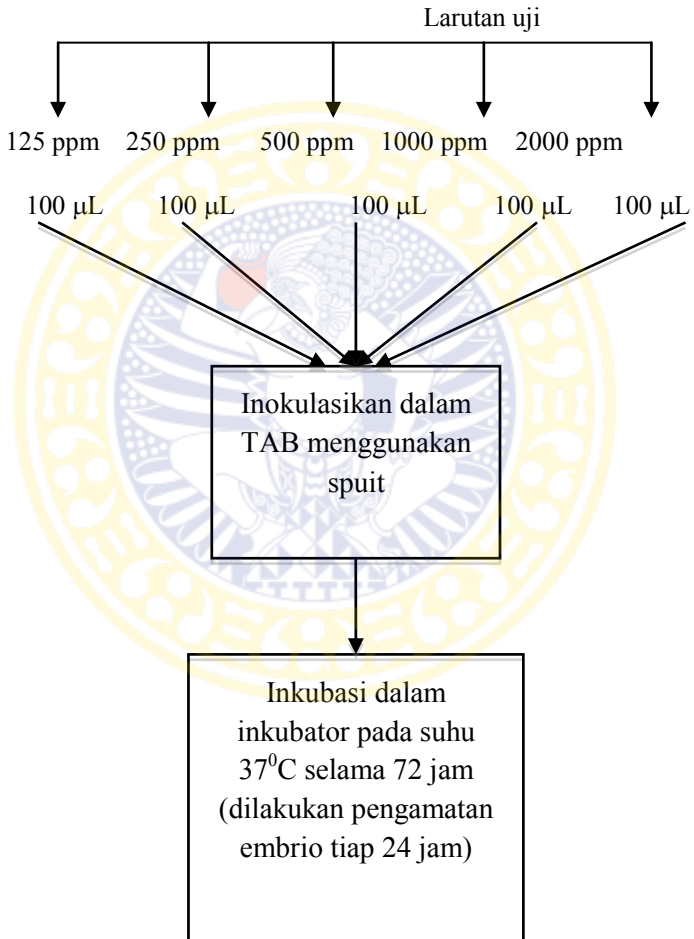
Lampiran 6

Skema prosedur kerja pengenceran berseri



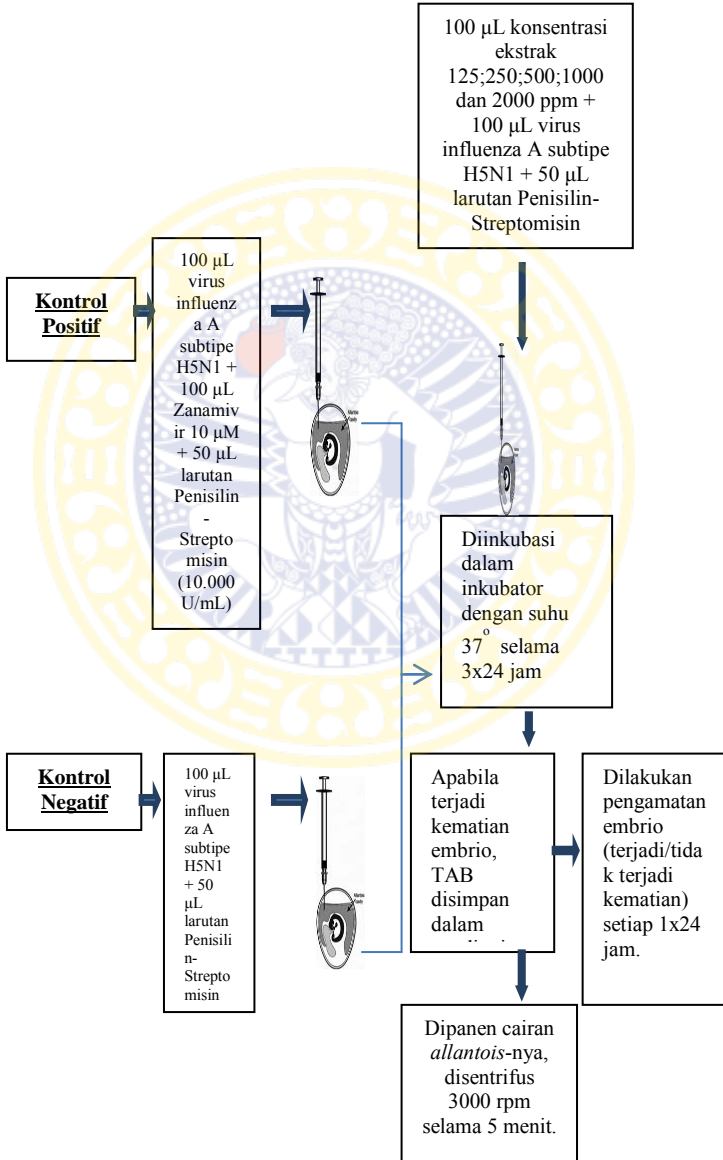
Lampiran 7

Skema prosedur kerja uji toksisitas dan pemilihan konsentrasi ekstrak



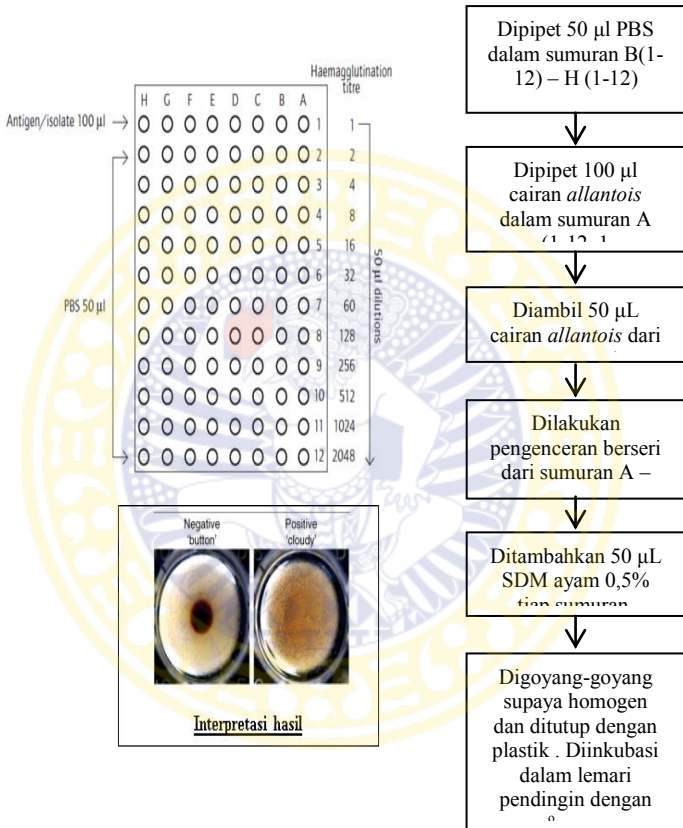
Lampiran 8

Skema prosedur kerja Inokulasi Pada TAB



Lampiran

Skema prosedur kerja Uji Hemaglutinasi (HA Test)

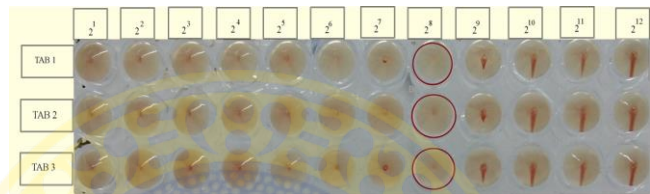


Lampiran 10

Titer HA Hasil Uji Hemaglutinasi

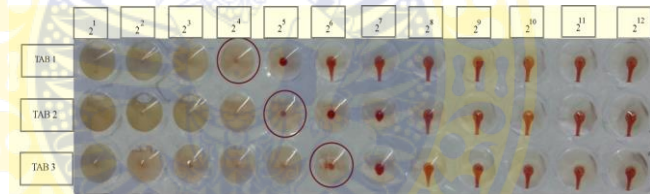
A. Kontrol Negatif

H5N1



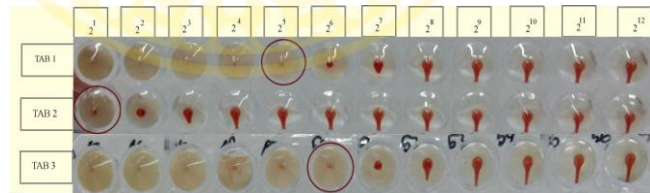
B. Kontrol positif

H5N1



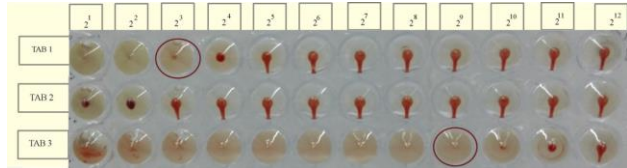
C. Ekstrak daun legundi 2000

ppm



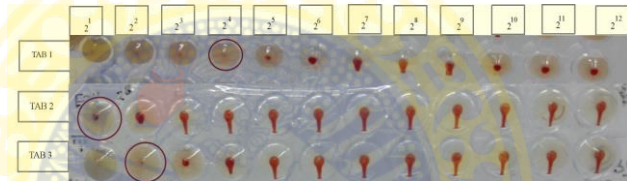
D. Ekstrak daun legundi 1000

ppm



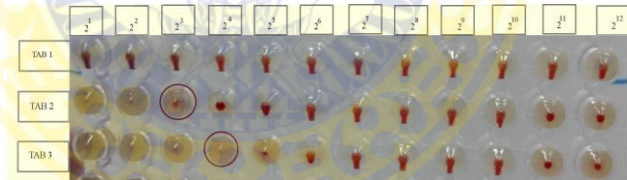
E. Ekstrak daun legundi 500

ppm



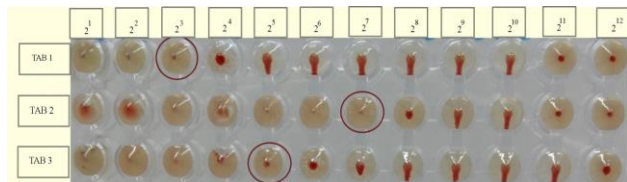
F. Ekstrak daun legundi 250

ppm



G. Ekstrak daun legundi 125

ppm



Lampiran 11

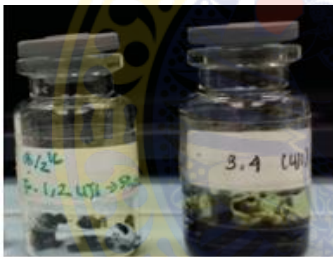
Proses Pembuatan Fraksi Legundi



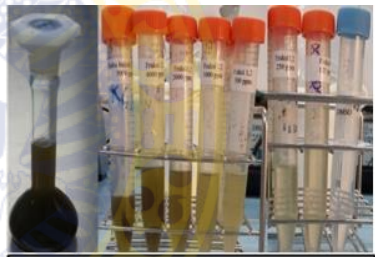
persiapan kromatografi kolom cepat



Proses fraksinasi



Fraksi yang digunakan



persiapan sampel uji



hasil Kromatografi kolom cepat



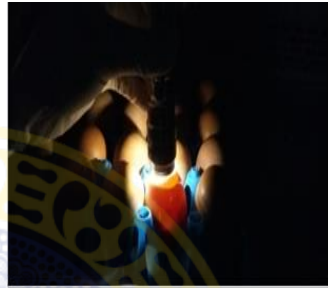
Rotary evaporator

Lampiran 12

Proses uji HA



persiapan sampel uji dan virus



candling TAB



panen cairan alantois



Inkubator TAB



uji HA



proses inokulasi