BAB V
HASIL PENELITIAN

5.1. Pembuatan Serbuk Simplisia

Daun legundi (*Vitex trifolia*) segar yang diperoleh dari Materia Medika Batu dipisahkan dari bahan asing dan dilakukan pencucian untuk menghilangkan kotoran, kemudian dikeringkan hingga bentuk daun mengkerut dan menimbulkan suara gemerisik atau rapuh saat diremas. Waktu pengeringan yang dibutuhkan hingga daun legundi benar – benar kering adalah 7 hari.

- Berat basah : 10 kg
- Berat kering : 1.545 g
- Berat serbuk : 1.467 g

5.2. Pembuatan Ekstrak *Vitex trifolia* dan Larutan Uji

Pembuatan ekstrak diawali dengan proses maserasi, yaitu serbuk daun legundi direndam dalam metanol selama ± 24 jam kemudian disaring dengan corong *Buchner*. Tiap 500 gram serbuk daun legundi direndam dalam 1,7 L metanol selama semalam. Proses ini diulang sebanyak tiga kali. Selanjutnya pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator*.

- Suhu : 40ºC
- Tekanan : ± 200 bar
- Berat serbuk : 1000 g
- Ekstrak cair : 8 L
- Ekstrak kental : 143 g

Ekstrak kental kemudian ditimbang sebanyak 10,0 mg dan dilarutkan hingga diperoleh larutan ekstrak uji dengan konsentrasi 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm.

5.3. Hasil Uji Toksisitas Ekstrak *Vitex trifolia* terhadap Telur Ayam Berembrio (TAB)

Larutan ekstrak uji diinjeksikan ke dalam 3 TAB untuk setiap konsentrasi. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37ºC selama 72 jam dan dilakukan pengamatan setiap 24 jam. Bila terjadi kematian, embrio tersebut dipindahkan ke dalam lemari pendingin suhu 4ºC selama 24 jam.

Tabel V.1. Hasil pengamatan uji toksisitas ekstrak terhadap TAB.

Konsentrasi Larutan Uji (ppm)	Waktu Inkubasi								
	24 Jam			48 Jam			72 Jam		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
62,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+
500	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan:
I, II, III : replikasi TAB
(+) : embrio hidup

Berdasarkan uji toksisitas tersebut, tidak ada embrio yang mati dalam inkubasi selama 72 jam. Hal ini menunjukkan bahwa larutan ekstrak metanol daun legundi tidak toksik dan aman digunakan untuk TAB pada semua konsentrasi uji, yaitu 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm. Sehingga semua konsentrasi larutan ekstrak tersebut dapat digunakan untuk tahap pengujian selanjutnya.

5.4. Hasil Uji Aktivitas Antivirus H5N1 pada TAB

Terdapat 3 kelompok perlakuan dalam uji aktivitas antivirus. Masing-masing kelompok diinokulasikan ke dalam 3 TAB. Kemudian TAB diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C dan diamati setiap 24 jam.

Tabel V.2. Perlakuan uji aktivitas ekstrak daun legundi terhadap virus H5N1

Kelompok	Inokulum pada TAB
Kontrol Negatif (KN)	Blanko, yaitu 100 µl campuran PBS + DMSO 2,5% dan 50 µl penisilin-streptomisin + 100 µl larutan virus H5N1 (pengenceran 100x *stock* virus)
Kontrol Positif (KP)	100 µl Zanamivir 10 mM dan 100 µl virus H5N1 (pengenceran 100x *stock* virus)
Uji (Ekstrak): 62,5 ppm, 250 ppm, 1000 ppm	100 µl ekstrak daun Legundi dan 50 µl penisilin-streptomisin + 100 µl virus H5N1 (pengenceran 100x *stock* virus)

ADRN - Perpustakaan Universitas Airlangga

Tabel V.3. Hasil pengamatan uji aktivitas ekstrak dalam TAB

Kelompok	TAB	Waktu Inokulasi		
		24 Jam	48 Jam	72 Jam
Kontrol Negatif (KN)	1	x		
	2	+	x	
	3	+	+	x
Kontrol Positif (KP)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
Ekstrak daun legundi 62,5 ppm	1	x		
	2	+	x	
	3	+	+	x
Ekstrak daun legundi 250 ppm	1	+	x	
	2	+	x	
	3	+	+	x
Ekstrak daun legundi 1000 ppm	1	+	x	
	2	+	x	
	3	+	+	+

Keterangan: (+) embrio hidup
(x) embrio mati

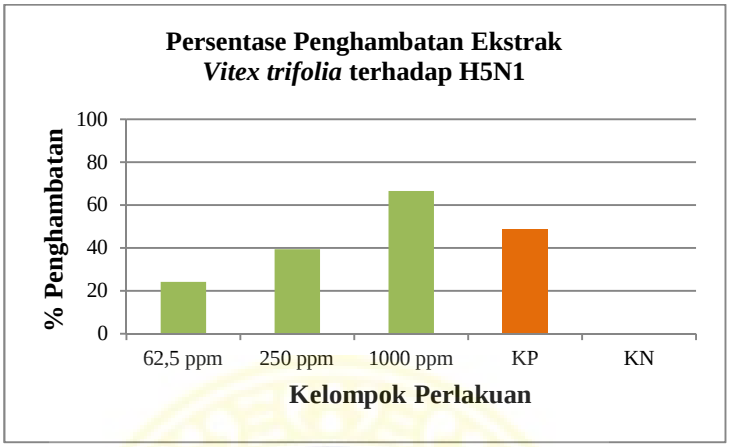
Pada pengamatan dapat dilihat, bahwa tidak semua TAB dapat bertahan hingga 72 jam. Hanya kontrol positif yang tidak mengalami kematian embrio pada semua TAB, sedangkan semua ekstrak daun legundi dan kontrol negatif mengalami kematian pada waktu yang bervariasi. TAB yang mati kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* 4°C dan dipanen alantoisnya. Kemudian alantois yang sudah dipanen diuji hemaglutinasinya.

5.5. Hasil Uji Hemaglutinasi (Uji HA)

Cairan alantois yang dipanen dari TAB setelah inokulasi kemudian diuji hemaglutinasinya dengan 0,6% RBC (*red blood cell*) ayam pada 96-*well plate* "V". Pengamatan dilakukan setelah 30 menit. Hasil positif adalah ketika terjadi endapan di dasar *well* dan negatif ketika tidak terjadi endapan. Titer HA dinyatakan dalam satuan HAU (*Hemagglutinating Unit*).

Tabel V.4. Hasil uji HA dan penghambatan virus H5N1

Kelompok	TAB	Titer HA	Rataan HA (^{2}log2)	% penghambatan
Ekstrak daun legundi 1000 ppm	1	2^0	3,67	66,67
	2	2^3		
	3	2^8		
Ekstrak daun legundi 250 ppm	1	2^9	6,67	39,39
	2	2^9		
	3	2^2		
Ekstrak daun legundi 62,5 ppm	1	2^7	8,23	24,24
	2	2^7		
	3	2^{11}		
Kontrol Positif (KP)	1	2^7	5,67	48,48
	2	2^4		
	3	2^6		
Kontrol Negatif (KN)	1	2^{11}	11	0
	2	2^{11}		
	3	2^{11}		



Gambar 5.1. Grafik persentase penghambatan ekstrak Legundi terhadap virus H5N1.

5.6. Hasil Uji Penghambatan Neuraminidase (NA *Inhibition*)

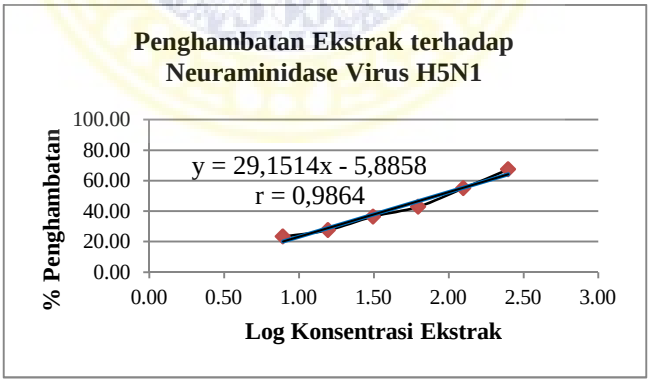
Uji penghambatan neuraminidase menggunakan metode Potier *et al.* (1979) yang telah dimodifikasi (Ikram *et al*., 2015) dengan MUNANA sebagai substrat. Konsentrasi ekstrak dalam *plate* adalah 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, 15,63 ppm, dan 7,81 ppm. Setiap perlakuan dilakukan 3 kali replikasi. Fluoresensi dari 4-Methylumbelliferyl yang terbentuk dalam reaksi segera diukur dengan *Modulus Microplate Reader* pada panjang gelombang 355 nm (Ikram *et al*., 2015). Kemudian dilakukan pengolahan data seperti pada Lampiran 6. Persentase penghambatan terhadap enzim neuraminidase virus H5N1 semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak daun legundi. Persentase penghambatan tertinggi dicapai pada konsentrasi ekstrak 250 ppm, yaitu 67,31 %.

5.7. Penentuan IC_{50} Ekstrak terhadap Neuraminidase Virus H5N1.

Setelah diperoleh data persentase penghambatan masing-masing konsentrasi ekstrak terhadap enzim neuraminidase, kemudian dibuat grafik logaritma konsentrasi ekstrak terhadap persentase penghambatan enzim neuraminidase sehingga dapat diketahui IC_{50} ekstrak *Vitex trifolia* terhadap virus H5N1.

Tabel V.5. Log konsentrasi ekstrak dan persentase penghambatan

Konsentrasi Ekstrak	Log Konsentrasi Ekstrak (x)	% Penghambatan (y)
250.00	2.40	67.31
125.00	2.10	54.97
62.50	1.80	42.87
31.25	1.49	36.41
15.63	1.19	27.55
7.81	0.89	23.30



Gambar 5.2. Grafik penghambatan ekstrak terhadap neuraminidase virus H5N1.

Berdasarkan grafik tersebut, dapat diperoleh persamaan regresi linear pada penghambatan ekstrak terhadap neuraminidase virus, yaitu y = 29,1514x - 5,8858 dan harga r sebesar 0,9864 dengan y adalah persentase penghambatan sedangkan x adalah log konsentrasi ekstrak. Selanjutnya, dilakukan perhitungan IC_{50} seperti berikut:

y = 29,1514x - 5,8858

50 = 29,1514x - 5,8858

x = 1,9171

log konsentrasi ekstrak = 1,9171

IC_{50} ekstrak = 82,62 ppm