

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DISERTASI

**HAMBATAN EKSTRAK KULIT BATANG *Sterculia quadrifida*
R.Br (FALOAK) PADA CD81 *CELL LINE* HEPATOSIT Huh7it
DAN NS3 *HELICASE* VIRUS HEPATITIS C JFH1**



MUHAJIRIN DEAN

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2019

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya peserta Program Studi Doktor Ilmu Farmasi,
Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga :

Nama : Muhajirin Dean

NIM : 051417097032

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Naskah Disertasi yang saya tulis dengan judul :

**Hambatan Ekstrak Kulit Batang *Sterculia quadrifida* R.Br (Faloak) Pada CD81 Cell
line Hepatosit Huh7it Dan NS3 Helicase Virus Hepatitis C JFH1**

adalah benar-benar merupakan konsep pemikiran dan hasil karya ilmiah saya sendiri.
Apabila di kemudian hari diketahui isi Naskah Disertasi ini merupakan hasil plagiat, maka
saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 02 Oktober 2019

Yang membuat pernyataan.



Muhajirin Dean

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya peserta Program Studi Doktor Ilmu Farmasi,
Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga :

Nama : Muhajirin Dean

NIM : 051417097032

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Naskah Disertasi yang saya tulis dengan judul :

**Hambatan Ekstrak Kulit Batang *Sterculia quadrifida* R.Br (Faloak) Pada CD81 Cell
line Hepatosit Huh7it Dan NS3 Helicase Virus Hepatitis C JFH1**

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet portal Garuda atau media lain yaitu Digital
Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik, sebatas sesuai dengan
Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya

Surabaya, 02 Oktober 2019

Yang membuat pernyataan,



Muhajirin Dean

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**HAMBATAN EKSTRAK KULIT BATANG *Sterculia quadrifida*
R.Br (FALOAK) PADA CD81 *CELL LINE* HEPATOSIT Huh7it
DAN NS3 *HELICASE* VIRUS HEPATITIS C JFH1**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Doktor Ilmu Farmasi
Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

Oleh:

MUHAJIRIN DEAN

051417097302

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2019

LEMBAR PENGESAHAN

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 30 OKTOBER 2019**

Oleh :

Promotor



**Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D
NIP. 19481012 197603 2001**

Ko-Promotor



**Junaidi Khotib, M.Kes., Ph.D., Apt
NIP. 197010221995121001**

Mengetahui,

Ketua Program Studi Doktor Ilmu Farmasi



**Prof. Dr. Siswandono, Apt., M.S.
NIP. 19521002 198002 1 001**

**Disertasi ini telah diuji pada Ujian Disertasi Tertutup
Tanggal 23 Oktober 2019**

PANITIA PENGUJI UJIAN DISERTASI TERTUTUP

Ketua : Prof. Dr. Siswandono, M.S., Apt

Anggota :

- 1. Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D**
- 2. Junaidi Khotib, M.Kes., Ph.D., Apt**
- 3. Prof. Dr. Sukardiman, MS., Apt**
- 4. Prof. Dr. Achmad Fuad Hafid, M.S, Apt**
- 5. Dr. rer nat. Mulya Hadi Sentosa, Apt**
- 6. Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si., Apt**
- 7. Prof. Dr. Suharjono, MS, Apt**
- 8. Prof. Dr. Mulyanto, dr.**

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

Nomor : 3146/UN3.1.5/PPd/2019

Tanggal : 16 Oktober 2019

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah Yang Maha Esa atas segala rahmat dan hidayahNya sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan disertasi ini.

Disertasi ini dapat terselesaikan berkat bantuan berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada :

Ibu Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D sebagai promotor yang telah membimbing saya dengan penuh kesabaran dan perhatian serta memberikan dorongan dan semangat untuk terus maju mengembangkan wawasan keilmuwan.

Bapak Junaidi Khotib, M.Kes., Ph.D., Apt sebagai ko-promotor, diantara kesibukannya telah memberikan dorongan semangat dan bimbingan dengan penuh kesabaran.

Rektor universitas Airlangga, Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., M.T., Ak., atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Pendidikan Program Doktor.

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. Dr. Hj. Umi Athijah, Apt., MS., atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Pendidikan Program Doktor.

Tim penguji : Prof. Dr. Siswandono, M.S., Apt, Prof. Dr. Sukardiman, MS., Apt, Prof. Dr. Achmad Fuad Hafid, M.S, Apt, Dr. rer nat. Mulya Hadi Sentosa, Apt, Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si., Apt, Prof. Dr. Suharjono, MS, Apt dan Prof. Dr. dr. Mulyanto atas masukan dalam perbaikan naskah disertasi ini.

Bapak/Ibu Dosen pengampu mata kuliah, Drs. Marcellino Rudyanto, Apt., M.Si., Ph.D, Prof. Dr. Muhamad Zainudin, Apt., Prof., Dr.rer.nat Mochamad Yuwono, Apt., M.S., Prof.Dr. Mangestuti Agil, Apt., MS., Prof. Dr. Bambang Prajogo Eko W., MS., Apt., dan Hadi Poerwono Drs., Apt., M.Sc., Ph.D dengan ucapan terima kasih banyak dan semoga ilmu yang diberikan memberikan manfaat ke masa yang akan datang.

Kepada teman-teman seangkatan Program Pendidikan Doktor Ilmu Farmasi Universitas Airlangga Dr. Niken Indrayanti, Apt, M. Amrun Hidayat, M.Farm., Apt, Joharman, M.Si., Apt, Joice, MS., Apt, Dian Nurmawati, Apt, Maximus Taek, M.Si yang membantu selama kuliah .

Mantan gubernur Nusa Tenggara Timur, Bapak Frans Lebu Raya yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh Pendidikan Program Doktor.

Mantan Direktur RSUD Prof. Dr. W. Z. Johannes Kupang, Bapak dr. Alfonsius Anapaku, SPOG yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh Pendidikan Program Doktor.

Ayahanda H. Ismail Dean, MM dan Ibunda Hj. Atin Salma yang telah membesarkan, mendidik dan tiada henti mendoakan dalam menjalankan dan menyelesaikan Program Pendidikan Program Doktor semoga Allah SWT membalas segalanya dengan ucapan “Allahummaghfirlii waliwalidayya warhamhumah kaamaarabbayaanii shagiirro”.

Ayah dan Ibu mertua yang selalu memberikan dorongan moril untuk menyelesaikan disertasi ini.

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Istri saya, dr. Viviyanti bin Wahidin yang telah memberikan dorongan moril sebelum, selama hingga menyelesaikan penulisan disertasi ini.

Guru-guru saya yang telah mendidik, membina dan memberikan ilmunya kepada saya selama menempuh Program Doktor.

Kepada Ibu Dita, Ibu Lidya dan Ibu Mirna dari Laboratorium Satreps ITD, Bapak Jarwo dari Laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Mas Renra dari Laboratorium Angler Surabaya atas bantuannya dalam pengerjaan sampel saya hingga selesai.

Akhirnya kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, saya ucapkan terima kasih atas bantuan yang saya terima, semoga amal kebajikannya menjadi amal jariyah dan semoga Allah SWT dapat membalas semuanya.

Semoga hasil dari penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi saya sendiri dan masyarakat Kota Kupang sebagai informasi atas kegunaan tanaman faloak.

Surabaya, 30 Oktober 2019

Penulis

RINGKASAN

**Hambatan Ekstrak Kulit Batang *Sterculia quadrifida* R.Br
(Faloak) Pada CD81 Cell line Hepatosit Huh7it dan NS3
helicase Virus Hepatitis C JFH1**

Muhajirin Dean

Infeksi virus hepatitis C (VHC) ini menjadi penting untuk difikirkan penanganannya, mengingat 55-85% infeksi VHC menjadi kronis. Virus hepatitis C mudah/sering mengalami mutasi sehingga belum dapat diproduksi vaksin untuk VHC dan belum ditemukan obat yang dapat menyembuhkan dengan sempurna untuk terapi infeksi VHC, maka dibutuhkan solusi untuk mengatasi hal ini. Beberapa contoh obat yang digunakan untuk terapi infeksi VHC antara lain adalah *pegylated* interferon alfa (IFN- α) dan ribavirin (RBV), obat golongan *protease inhibitor* (NS3 *inhibitor*) contohnya boceprevir, telaprevir dan simeprevir dan NS5B *nukleotida inhibitor* yaitu sofosbuvir.

Senyawa flavonoid turunan katekin yaitu epikatekin yang berasal dari kulit batang tanaman *Sterculia tragacantha* famili *Sterculiaceae* telah berhasil diisolasi. Senyawa epikatekin menghambat replikasi RNA VHC JFH1 dan menurunkan inflamasi yang disebabkan VHC JFH1 serta dapat berikatan dengan protein NS3 VHC.

Faloak merupakan salah satu spesies dari Genus *Sterculia*, Famili *Sterculiaceae*, oleh masyarakat di Kota Kupang, Provinsi Nusa Tenggara Timur, Indonesia telah digunakan untuk menyembuhkan penyakit kuning atau hepatitis. Dalam penelitian sebelumnya ditemukan bahwa dalam ekstrak air kulit batang faloak mengandung flavonoid.

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan nilai CC_{50} , IC_{50} , identifikasi dan menentukan kadar senyawa epikatekin, mengetahui pengaruh ekstrak kulit batang faloak pada infeksi VHC, yaitu terhadap ekspresi reseptor CD81 Cell line hepatosit Huh7it dan ekspresi NS3 *helicase* VHC JFH1 dalam kultur *Cell line* hepatosit Huh7it dengan metode *western blotting*.

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian secara *in vitro*. Untuk pengujian aktifitas ekstrak n-heksan, air dan alkohol 70% kulit batang faloak dimulai dengan penentuan toksisitas (CC_{50}) menggunakan metode MTT *Assay*, penentuan IC_{50} , uji *time addition* dan diakhiri dengan uji *western blotting*. Untuk pengujian kandungan senyawa epikatekin menggunakan metode *Liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry* (LC-MS/MS) *Triple Quad 4000 System*.

Hasil yang diperoleh pada pengujian CC_{50} pada kultur *Cell line* hepatosit Huh7it yaitu ekstrak kulit batang faloak dengan pelarut n-heksan dengan CC_{50} sebesar 745.49 $\mu\text{g/ml}$, air CC_{50} sebesar 2007.25 $\mu\text{g/ml}$ dan alkohol 70% sebesar 3015.91 $\mu\text{g/ml}$. Dapat disimpulkan bahwa pada konsentrasi uji 3.125 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ 50 $\mu\text{g/ml}$ dan 100 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak n-heksan, air dan alkohol 70% kulit batang faloak memiliki tingkat toksisitas yang rendah karena memenuhi kriteria yaitu viabilitas sel $>50\%$.

Hasil pengujian IC_{50} terhadap VHC JFH1 pada kultur *Cell line* hepatosit Huh7it yaitu ekstrak kulit batang faloak pada konsentrasi 3.125 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ 50 $\mu\text{g/ml}$ dan 100 $\mu\text{g/ml}$ dengan pelarut n-heksan diperoleh IC_{50} sebesar 128.44 $\mu\text{g/ml}$, air sebesar 16,40 $\mu\text{g/ml}$ dan alkohol 70% sebesar 16,85 $\mu\text{g/ml}$. Dapat disimpulkan bahwa pada berbagai konsentrasi ekstrak n-heksan kulit batang faloak memiliki daya hambat yang kurang baik karena tidak memenuhi kriteria $\leq 25 \mu\text{g/ml}$ sedangkan ekstrak air dan alkohol 70% kulit batang faloak memiliki daya hambat yang memenuhi kriteria. Beberapa hasil ini dikarenakan komposisi dan jumlah senyawa yang berbeda pada setiap ekstrak.

Hasil perhitungan *selectivity index* dengan membandingkan CC_{50} dan IC_{50} dari ekstrak n-heksan, air dan alkohol 70% kulit batang faloak. Diperoleh hasil untuk ekstrak n-heksan 5.80, ekstrak air 120.63, dan ekstrak alkohol 70% 178.99. dari ketiga ekstrak kulit batang faloak ini memenuhi kriteria *selectivity index* > 3 .

Uji kualitatif ekstrak air dan alkohol 70% kulit batang faloak dengan menggunakan instrumen LC-MS/MS *Triple Quad 4000 System*. Diperoleh ekstrak kulit batang faloak dalam pelarut air dan alkohol 70% mengandung senyawa epikatekin dengan puncak grafik pada RT 3.90 dengan m/z 286-290 berdasarkan *data library* dari *Program Analyst Instrument Control and Data Processing Software* AB Sciex pada instrumen LC MS/MS Ab Sciex 4000. Hasil uji kuantitatif LC-MS/MS *Triple Quad 4000 System* pada ekstrak air kulit dan alkohol 70% batang faloak mengandung epikatekin 942 mg/kg dan 872 mg/kg. Pada pemeriksaan dengan instrumen LC-MS/MS *Triple Quad 4000 System* digunakan standar (-)-epikatekin $\geq 98\%$ dari *Sigma Aldrich* dengan nomor katalog E4018.

Hasil uji dengan metode *time addition* ekstrak air kulit batang faloak dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$ dapat menghambat *entry* (masuknya VHC JFH1 kedalam *cell line* hepatosit Huh7it) sebesar 93,97%, dan hambatan *post entry* (replikasi VHC JFH1 dalam *Cell line* hepatosit Huh7it) sebesar 96,75%. Ekstrak alkohol 70% kulit batang faloak dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$ dapat menghambat *entry* VHC JFH1 kedalam *Cell line* hepatosit Huh7it sebesar 86,13%, dan *post entry* (replikasi VHC JFH1 dalam *Cell line* hepatosit Huh7it) sebesar 97,09%. Pada konfirmasi uji *entry post-entry* pemberian ekstrak air maupun alkohol 70% kulit batang faloak dapat menghambat VHC JFH1 kedalam *Cell line* hepatosit Huh7it sebesar 100%.

Hasil uji *western blotting* untuk melihat ekspresi protein CD81 *Cell line* hepatosit Huh7it yang dipapar dengan VHC JFH1 pada pemberian ekstrak air atau alkohol 70% kulit batang faloak dengan menggunakan antibodi dari Abcam (ab109201). Pengujian dilakukan setelah 2 jam inkubasi dengan dipapar VHC JFH1 dan ekstrak air atau alkohol 70% kulit batang faloak dengan konsentrasi masing-masing 20 $\mu\text{g/ml}$ dan 40 $\mu\text{g/ml}$. Analisis secara kuantitatif dilakukan untuk mengetahui hambatan ikatan protein CD81 *Cell line* hepatosit Huh7it dan VHC JFH1 dalam satuan persen (%), diawali dengan menghitung densitas band protein menggunakan *software ImageJ*[®] yang dibandingkan dengan kontrol yang tidak dipapar dengan ekstrak kulit batang faloak. Setelah luas area diperoleh maka ditentukan persentase hambatan. Diperoleh hambatan protein CD81 *Cell line* hepatosit Huh7it pada ekstrak air kulit batang faloak pada konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 53.20% dan

40µg/ml sebesar 90.67%. Sedangkan ekstrak alkohol 70% kulit batang faloak pada konsentrasi: 20µg/ml sebesar 13.17% dan 40µg/ml sebesar 44.04%.

Uji *western blotting* protein NS3 *helicase* VHC JFH1 yang dipaparkan pada kultur *Cell line* hepatosit Huh7it pada pemberian ekstrak air atau alkohol 70% kulit batang faloak dengan menggunakan antibodi dari Abcam (Ab18830). Diawali dengan *Cell line* hepatosit Huh7it dipapar dengan VHC JFH1 dan diinkubasi selama 2 jam. Pengujian dilakukan setelah diberikan ekstrak air atau alkohol 70% kulit batang faloak dengan konsentrasi masing-masing 20 µg/ml dan 40 µg/ml dan inkubasi selama 46 jam. Analisis dilakukan untuk mengetahui hambatan ekspresi protein NS3 *helicase* VHC JFH1 dalam satuan persen (%), diawali dengan menghitung luas area menggunakan *software ImageJ*[®] yang dibandingkan dengan kontrol. Setelah luas area diperoleh maka ditentukan persentase hambatan. Diperoleh hambatan ekspresi protein NS3 *helicase* VHC JFH1 pada ekstrak ekstrak air pada konsentrasi: 20µg/ml sebesar 68.64% dan 40µg/ml sebesar 80.08%. Sedangkan ekstrak alkohol 70% pada konsentrasi: 20µg/ml sebesar 60.60% dan 40µg/ml sebesar 63.08%.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan ekstrak air dan alkohol 70% kulit batang faloak secara umum dapat menghambat masuknya VHC JFH1 pada tahap *entry* maupun replikasi VHC JFH1 pada *post entry*, namun secara spesifik hambatan pada tahap *entry* <50% atau menghambat dengan lemah dan tahap *post entry* hambatan >50% atau menghambat dengan kuat.

SUMMARY

Inhibition Effect of Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) Stem Bark Extract on CD81 Huh7it Cell Line Hepatocytes and NS3 helicase Hepatitis C Virus JFH1

Muhajirin Dean

It is important to think about the treatment for Hepatitis C Virus (HCV) infection considering 55-85% of HCV infection that becomes chronic. Hepatitis C virus easily and frequently undergoes a mutation resulting in no vaccine for HCV having been produced and a medication that can fully cure HCV infection has not been discovered. A solution to overcome this problem needs to be developed. Among the medications used in HCV infection therapy are *pegylated interferon alpha* (IFN- α) and ribavirin (RBV), group of protease inhibitor medicine (NS3 inhibitor) such as boceprevir, telaprevir, and simeprevir and NS5B nucleotide inhibitor such as sofosbuvir.

Flavonoid compound derived from catechin named epicatechin originating from stem bark of *Sterculia tragacanth*, *Sterculiaceae* family has been successfully isolated. Epicatechin compound inhibits the replication of HCV JFH1 and reduces inflammation caused by HCV JFH1 that can bind HCV NS3 protein.

Faloak is one of the species of *Sterculia* genus that has been used by people of Kupang City, East Nusa Tenggara Province, Indonesia to cure jaundice or hepatitis. In previous studies, it is found that the extract of faloak bark contains flavonoid.

The aims of this study are to determine the levels of CC_{50} and IC_{50} , identifying and determining the epicatechin compound, understanding the effect of faloak bark extract on HCV infection, namely its inhibition on CD81 hepatocyte Huh7it cell line and the inhibition on NS3 helicase expression of JFH1 HCV in hepatocyte Huh7it cell line by using western blotting method.

The examination on faloak stem bark extracts inhibition in vitro manner. The examination of faloak bark extract with n-hexane, water, and alcohol 70% activities starts with toxicity (CC_{50}) examination using MTT Assay method, IC_{50} measurement, time addition test, and ended with the western blotting test. The measurement of epicatechin compound content was conducted by using Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) method Triple Quad 4000 System.

The CC_{50} examination on hepatocyte Huh7it cell line culture indicates that CC_{50} of faloak stem bark extracts with n-hexane is 745.49 $\mu\text{g/ml}$, water 2007.25 $\mu\text{g/ml}$, and alcohol 70% 3015.91 $\mu\text{g/ml}$. From this finding, it can be concluded that at the test concentration of 3.125 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$, and 1000 $\mu\text{g/ml}$ of n-hexane extract, water, and alcohol 70% faloak stem bark extract has a low toxicity because it has met criterion of high cell viability, more than 50%.

The IC_{50} examination of HCV JFH1 on hepatocyte Huh7it cell line culture indicates that IC_{50} of faloak bark extract at concentration of 3.125 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, and 100 $\mu\text{g/ml}$ in n-hexane solvent is 128.44 $\mu\text{g/ml}$, in water 16.40 $\mu\text{g/ml}$, and in alcohol 70% 16.85 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, at different concentrations, faloak bark extract with n-hexane solvent has poor

inhibition because it does not meet the criterion of $\leq 25 \mu\text{g/ml}$. Meanwhile, faloak stem bark extracts with water and alcohol 70% has inhibition meeting the criterion. Different composition and number of compounds in each extract affect this distinctive result.

The selective index measurement conducted by comparing CC_{50} and IC_{50} values of faloak stem bark extracts in n-hexane, water, and alcohol 70% indicates the value for n-hexane extract 5.80, water extract 120.63, and alcohol 70% extract 178.99. The result for these three faloak bark extracts has met the selective index criteria >3 .

The identification examination on faloak stem bark extracts in water and alcohol 70% using LC-MS/MS Triple Quad 4000 System instrument finds that faloak stem bark extracts in 70% water and alcohol solvent contained compound epicatechin with peak graph at RT 3.90 with m/z 286-290 based on library data from the AB Sciex Analyst Instrument Control and Data Processing Software Program on LC MS / MS Ab Sciex 4000. The LC-MS/MS Triple Quad 4000 System quantitative test examination indicates that faloak stem bark extracts in water and alcohol 70% solvent contains epicatechin 942 mg/kg and 872 mg/kg. Examination using LC-MS/MS Triple Quad 4000 System applies standard (-)-epicatechin $\geq 98\%$ of Sigma Aldrich with catalogue Number E4018.

The examination using time addition method on faloak stem bark extracts in water solvent at $40 \mu\text{g/ml}$ concentration is able to provide entry inhibition (HCV JFH1 entering hepatocyte Huh7it cell line) as much as 93.97% and post-entry inhibition (HCV JFH1 replication in hepatocyte Huh7it cell line) as much as 96.75%. faloak stem bark extracts $40 \mu\text{g/ml}$ extract in alcohol 70% provides entry inhibition (HCV JFH1 entering hepatocyte Huh7it cell line) as much as 86.13% and post-entry inhibition (HCV JFH1 replication in hepatocyte Huh7it cell line) as much as 97.09%. In entry/post-entry confirmation test indicates that the administration of faloak stem bark extracts in water or alcohol 70% solvent can inhibit HCV JFH1 inside hepatocyte Huh7it cell line as much 100%.

The western blotting test is conducted to identify the expression of CD81 hepatocyte Huh7it cell line exposed to HCV JFH1 on the administration of faloak stem bark extracts in water and alcohol 70% using antibody of Abcam (ab109201). The examination is performed 2 hours after incubation by exposing HCV JFH1 to $20 \mu\text{g/ml}$ and $40 \mu\text{g/ml}$ faloak stem bark extracts in water and alcohol 70%. The quantitative analysis is carried out to identify the percentage of binding inhibition between CD81 hepatocyte Huh7it cell line and NS3 helicase HCV JFH1. The analysis is initiated by measuring protein band density using *ImageJ*® software compared to the control group not exposed to faloak stem bark extracts. After determining the width of experimentation area, the inhibition percentage can be measured. The result indicates that the inhibition of CD81 hepatocyte Huh7it cell line for faloak stem bark extract with water solvent is 53.20% for $20 \mu\text{g/ml}$ concentration and 90.67% for $40 \mu\text{g/ml}$ concentration. Meanwhile, the results for faloak bark extract with alcohol 70% solvent are 13.17% for $20 \mu\text{g/ml}$ concentration and 44.04% for $40 \mu\text{g/ml}$.

The western blotting test was carried out on NS3 helicase protein of HCV JFH1 exposed to hepatocyte Huh7it cell line culture on the administration of faloak stem bark extracts with water or alcohol 70% solvent using antibody from Abcam (Ab18330). The test is initiated by exposing hepatocyte Huh7it cell line to HCV JFH1 and being incubated for 2 hours. The examination was conducted after the

administration of faloak stem bark extracts in water or alcohol 70% with concentration of 20 µg/ml and 40 µg/ml and 46 hours incubation. An analysis is carried out to identify the inhibition of HCV JFH1 NS3 helicase protein in the unit of percent (%) initiated by measuring the width of area using *ImageJ*® software compared to control. Inhibition percentage is measured after determining area width. The finding shows inhibition of NS3 helicase protein HCV JFH1 expression for water solvent extract with concentration 20 µg/ml is 68.64% and 80.08% for 40 µg/ml while for alcohol 70% solvent extract the inhibition is 60.60% for 20 µg/ml concentration and 63.08% for 40 µg/ml concentration.

It can be concluded that in general, faloak stem bark extracts in water or alcohol 70% solvent can inhibit the entry of HCV JFH1 at entry phase and inhibit the replication of HCV JFH1 at post-entry phase. Hence, faloak extract can be developed as medicinal ingredients or herbal medicine in preventing or treating HCV JFH1 infection.