

UJI AKTIVITAS ANTIVIRUS EKSTRAK ETANOL DAUN BANDOTAN (*Ageratum conyzoides*) TERHADAP VIRUS NEWCASTLE DISEASE

Miftah Muhayaroh, Azis Saifudin,
Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah
Surakarta,

Abstrak

Virus *Newcastle disease* merupakan *avian paramyxovirus* yang bisa menyerang sistem pernapasan. ND memiliki protein HN (*hemagglutinin neuraminidase*) mengaglutinasi sel darah merah. Secara umum pengobatan antivirus diatasi dengan beberapa hal, seperti penggunaan tanaman herbal. *Ageratum conyzoides* termasuk tanaman herbal yang dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional masyarakat. *Ageratum conyzoides* mengandung senyawa kimia yaitu quercetin (flavonoid). Pada dosis sedang, daun bandotan dengan ekstrak etanol menunjukkan perlakuan antivirus yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antivirus ekstrak etanol daun bandotan terhadap virus ND. *Ageratum conyzoides* diekstraksi dengan metode maserasi. Hasil ekstraksi kemudian diinokulasikan ke dalam telur ayam berembrio (TAB) berumur 9-12 hari dan diinkubasi selama 3 hari. Sebanyak 12 telur ayam dibagi menjadi 4 kelompok (kontrol virus, 1µg/mL, 10µg/mL dan 100µg/mL). Selama proses inkubasi, dilakukan pengecekan telur untuk melihat kematian embrio. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji hemaglutinasi. Prinsip uji hemaglutinasi adalah adanya pengikatan antara protein virus dengan reseptor yang berada di permukaan eritrosit. Hasil uji hemaglutinasi menunjukkan tidak adanya aktivitas antivirus dari ekstrak etanol daun bandotan yang ditandai dengan tidak terbentuknya dot pada sumuran mikropate. Beberapa faktor yang menyebabkan kegagalan seperti, lama penyimpanan dan suhu. Pada lama penyimpanan akan sangat berpengaruh terhadap ekstrak daun bandotan karena semakin lama penyimpanan maka semakin banyak meningkatkan aktivitas mikroorganisme yang dapat menyebabkan kegagalan.

Kata Kunci: Newcastle Disease, ekstrak etanol, *Ageratum conyzoides*, antivirus, uji hemaglutinasi.

Abstract

Newcastle disease virus is an *avian paramyxovirus* that can attack the respiratory system. ND has the HN protein (*hemagglutinin neuraminidase*) agglutinating red blood cells. In general, antiviral treatment is treated with several things, such as the use of herbal plants. *Ageratum conyzoides* includes herbal plants that are used in traditional medicine. *Ageratum conyzoides* contains a chemical compound, namely quercetin (flavonoid). At moderate doses, bandotan leaves with ethanol extract show high antiviral treatment. This study aims to determine the antiviral activity of the ethanol extract of bandotan leaves against the ND virus. *Ageratum conyzoides* was extracted by maceration method. The extraction results were then inoculated into embryonated chicken

eggs (TAB) aged 9-12 days and incubated for 3 days. A total of 12 chicken eggs were divided into 4 groups (viral control, 1µg/mL, 10µg/mL and 100µg/mL). During the incubation process, eggs are checked to see if the embryos die. The method used in this study was the hemagglutination test. The principle of the hemagglutination test is that there is a binding between the viral protein and the receptor on the surface of the erythrocytes. The results of the hemagglutination test showed no antiviral activity from the ethanol extract of bandotan leaves which was characterized by the absence of dot formation in the microplate wells. Several factors caused failure such as storage time and temperature. The length of storage will greatly affect the bandotan leaf extract because the longer the storage, the more it increases the activity of microorganisms which ultimately results in failure.

Keywords: Newcastle Disease, ethanol extract, *Ageratum conyzoides*, antiviral, hemagglutination test.

1. PENDAHULUAN

Virus *Newcastle disease* merupakan penyakit menular dengan tingkat kematian tinggi karena strain virulen *avian paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) hingga serotipe 9 (AMPV-9), genus *paramyxovirus* yang termasuk dalam famili *Paramyxoviridae* (Ganar et al., 2014). *Newcastle disease* dapat menyerang pada sistem pernafasan, pencernaan, dan saraf. Pola penyebaran dan penularan yang cepat berdampak pada kerugian ekonomi yang besar pada bidang perunggasan (Hodder et al., 1994) dan bisa menginfeksi manusia walaupun tingkat kejadiannya sedikit (Abdisa and Tagesu, 2017). *Newcastle Disease Virus* (NDV) menyerang permukaan sel dengan cara mengenali dan mengikat molekul yang mengandung asam sialat seperti glikoprotein dan glikolipid. Virus ini memiliki protein HN (*hemagglutinin neuraminidase*) mengaglutinasi sel darah merah (De Leeuw dan Peeters, 1999).

Secara umum pengobatan antivirus diatasi dengan beberapa hal, seperti penggunaan tanaman herbal. Pada tanaman herbal memiliki ketahanan yang lebih lemah daripada obat-obatan kimia tradisional karena berbagai senyawa yang dikandungnya. (Jin et al., 2017). Tanaman herbal sering dimanfaatkan sebagai agen antivirus karena kandungan komponen seperti alkaloid, terpenoid, flavonoid, kumarin, dan antrakuinon yang tinggi. Mekanisme aksi dari komponen tersebut adalah dengan membunuh virus atau mempengaruhi replikasi dari virus tersebut (Bakari GG et al., 2012). Tanaman herbal banyak digunakan karena mudah ditemukan disekitaran masyarakat, aman dan efektif dalam pengobatan. Tanaman Bandotan adalah salah satu jenis tanaman herbal yang tumbuh liar di seluruh wilayah Indonesia.

Tanaman bandotan (*Ageratum conyzoides*.) termasuk tanaman yang dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional masyarakat, diantaranya daun dan batang yang masih muda, yang biasa dikonsumsi untuk obat panas, radang, malaria, radang paru-paru, pendarahan rahim, maag, kontrasepsi, dll. tumor rahim digunakan (Kusuma & Zaky, 2005). Tanaman bandotan tidak sulit dicari karena ada di ladang, kebun, pekarangan, dan pinggir jalan. Tinggi tanaman 10-120 cm, batang tegak atau sujud, berdaun tunggal dan berbentuk kubus, dengan bentuk bulat bergerigi dan ujung runcing (Bamidele et al., 2010). Seluruh bagian tanaman bandotan dapat dimanfaatkan sebagai obat. Daun bandotan mengandung senyawa kimia yaitu quercetin (flavonoid), triterpenoid (terpenoid), eugenol (minyak atsiri), dan saponin (Egi & Dianiatik, 2010)

Penelitian Kotta (2020) menemukan bahwa daun bandotan memiliki sifat antipiretik. Tanaman Bandotan memiliki sifat antipiretik (penurun demam) karena mengandung komponen flavonoid (Kotta et al., 2020). Daun bandotan juga bisa digunakan untuk mengobati batuk. Pada dosis sedang, daun bandotan dengan ekstrak etanol menunjukkan perlakuan antivirus yang tinggi (Kasrina et al., 2021). Selain itu, penelitian (Achuwa, 2006) melaporkan bahwa daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) dengan menggunakan ekstrak kloroform mampu menghambat pertumbuhan virus *Newcastle disease*, dengan berbagai konsentrasi yang menunjukkan semakin tinggi konsentrasi semakin besar pula penghambatan terhadap pertumbuhan virus.

Berdasarkan pada data di atas, dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah daun bandotan memiliki efek antivirus dengan menggunakan ekstrak yang berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu dengan menggunakan ekstrak etanol terhadap virus *Newcastle disease*..

2. METODE

2.1 alat

Alat dalam penelitian yaitu neraca analitik (ohaus), *buncher*, *rotary evaporator* (Stuart RE300B), sonikator, inkubator, spuit injeksi 1 mL, microplate dasar U, flakon, mikropipet (Socorex), *yellow tip*, *white tip*, *blue tip*, PCR tube 1,5 mL (OneMed), LAF (Laminar Air Flow), bor pelubang, inkubator (Nuair TM IR autoflow), lampu senter, autoklaf, sentrifugator (Hettich Mikro 200 R).

2.2 Bahan

Bahan pada penelitian adalah TAB (telur ayam berembrio) usia 9 hari yang diperoleh dari peternak di daerah Boyolali. Bahan lainnya meliputi vaksin aktif Medivac ND La Sota, daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) yang diperoleh dari kota Bengkulu, DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) for synthesis, etanol 96% teknis, kertas saring, PBS (*Phosphate Buffer Saline*), eritrosit ayam, EDTA (*Ethylene diamine tetra acetic acid*), antibiotik ampicilin (*Ampicillin sodium salt Sigma*), antibiotik streptomisin (*Streptomycin sulfate salt Sigma*), WFI (*Water for injection*), dan alumunium foil.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Ekstraksi

Daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) sebanyak 3kg dibersihkan dan dikeringkan selama 2 hari. Kemudian, daun bandotan diblender dan ditimbang. Kemudian 200 g dimaserasi dengan menggunakan 2 liter etanol 96% (1:10) 2x24 jam. Dilakukan remaserasi selama 1 hari menggunakan 550 ml etanol. Setelah maserasi selama 3 hari, disaring dengan saringan dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evapotarory* hingga menjadi ekstrak kental (Harianingsih et al., 2017). Hasil ekstrak digunakan untuk uji aktivitas terhadap virus Newcastle disease.

2.3.2 Preparasi Antibiotik

Antibiotik ampicilin 1000 mg dan streptomisin 1000 mg masing-masing dilarutkan dalam 5 ml WFI hingga larut lalu dicampur.

2.3.3 Persiapan sampel

Larutan stok ekstrak etanol daun bandotan dibuat dengan melarutkan 10 mg ekstrak kental dalam 10 ml DMSO hingga konsentrasi 1 mg/ml. Pengenceran seri konsentrasi dibuat dengan mengambil 1 µl, 10 µl dan 100 µl. Masing-masing senyawa kemudian dilarutkan dalam 1 mL konsentrasi target DMSO 1 µg/mL, 10 µg/mL, dan 100 µg/mL. Sebanyak 0,3 ml antibiotik ditambahkan pada masing-masing konsentrasi diinkubasi dengan temperatur 37°C selama 30 menit untuk memaksimalkan efek antibiotik (Setyasari, 2007).

2.3.4 Preparasi Virus ND

Vaksin aktif Medivac ND La Sota sebanyak 500 dosis dalam bentuk padat kering diperoleh dari toko unggas di dekat Kartasura. Vaksin disimpan pada suhu -4°C. 500 dosis vaksin dilarutkan dalam 10 ml PBS sehingga 1 ml vaksin memuat 50 dosis atau

500 virus ND. Untuk menghindari kontaminasi bakteri (Ashraf et al., 2017). Kemudian ditambahkan 0,3 ml antibiotik ampicilin dan 0,3 ml antibiotik streptomisin diinkubasi dengan temperatur 37°C selama 60 menit untuk memaksimalkan efek antibiotik.

2.3.5 Persiapan telur uji

Telur ayam berembrio kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C menggunakan inkubator hingga berumur 9-12 hari dengan memastikan telur memiliki ukuran dan bentuk yang sama. Telur ayam berembrio dibalik sehari dua kali. Sebelum dilakukan injeksi, telur di candling kembali untuk memastikan fertilitas dari embrio dengan memeriksa menggunakan lampu untuk memastikan embrio masih hidup di dalam telur. Fertilitas embrio dibuktikan dengan adanya pergerakan dan pembuluh darah yang terdapat di dalam telur (Ayu and Kencana, 2017). . Kemudian, telur diberi tanda pada bagian rongga udara secara melingkar menggunakan spidol. Tempat injeksi dipastikan tidak mengenai pembuluh darah yang terdapat di dalam telur

2.3.6 Preparasi suspensi eritrosit 1%

Eritrosit ayam diperoleh dari rumah potong ayam di area kampus UMS. Sel darah merah diletakkan ke tabung PCR 1,5 ml yang berisi EDTA 20 mg sebagai antikoagulan. Plasma dipisahkan dari darah dengan cara sentrifugasi selama 15 menit pada 3000 rpm. Plasma (supernatan) dibuang dan eritrosit yang mengendap dicuci tiga kali dengan PBS untuk mendapatkan konsentrasi eritrosit 100%. Suspensi eritrosit 1% dibuat dengan perbandingan eritrosit terhadap PBS yaitu 1:99 atau 1 tetes eritrosit ditambah 99 tetes PBS (Fitrawati et al., 2017).

2.3.8 Inokulasi Sampel dan Virus ke dalam ruang alantois

Sterilisasi dilakukan untuk semua alat yang tahan panas tinggi dengan menggunakan oven dengan temperatur 170°C selama 1 jam dan autoclave dengan temperatur 120°C selama 20 menit untuk alat yang tidak tahan panas tinggi. Cangkang telur kemudian dibersihkan dan dikeringkan dengan LAF menggunakan kapas dan tisu basah yang tidak mengandung alkohol. Kemudian, dengan menggunakan bor khusus, buat lubang di bagian atas cangkang telur di area yang terdapat rongga udara. Kemudian jarum suntik 1 ml digunakan untuk menyuntikkan sampel.

Tempatkan jarum secara vertikal dan perlahan masukkan jarum melalui lubang di telur. Masukkan kurang dari 16 mm mesh ke dalam telur untuk mencapai ruang allantoic.

Pada kelompok uji, masing-masing sampel diinjeksikan ke dalam allantoic chamber dengan variasi konsentrasi yang telah ditentukan sebagai berikut:

1. Kelompok 1 hingga 0,2 ml ekstrak kental pada konsentrasi 1 µg/ml + 0,2 ml suspensi virus yang diberi antibiotik
2. Kelompok 2 hingga 0,2 ml ekstrak kental dengan konsentrasi 10 µg/ml + 0,2 ml suspensi virus saat diberi antibiotik
3. Kelompok 3 hingga 0,2 ml ekstrak kental pada konsentrasi 100 µg/ml + 0,2 ml suspensi virus yang diberi antibiotik
4. Kelompok 4 adalah kontrol negatif yang disuntik hingga 200 L vaksin virus penyakit Newcastle yang dibubuhi antibiotik dalam 3 butir telur tanpa terapi campuran.

TAB yang telah diproses ditutup lubangnya dengan selotip untuk menghindari kontaminasi. TAB diinkubasi 3 x 24 jam dengan temperatur 37°C kemudian dinyalakan 1 x 24 jam. Embrio yang mati setelah kurang dari 24 jam dibuang, sedangkan embrio yang mati selama inkubasi 2 x 24 jam ditempatkan dalam lemari es pada suhu 4 °C. Embrio yang masih hidup sampai masa inkubasi 3 x 24 jam dikorbankan dengan cara dimasukkan ke dalam lemari pendingin semalaman untuk mencegah perdarahan selama pengumpulan allantoic. Pendinginan juga dikatakan mempermudah asimilasi cairan alantois sebagai bahan uji hemaglutinasi (Ashraf et al., 2017).

2.3.9 Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dilakukan untuk menghitung titer virus ND menggunakan pelat mikrotiter U 96-sumur. 50 µl larutan PBS ditambahkan ke semua sumur bernomor 1-12. Selanjutnya, 50 µl cairan alantoat yang mengandung senyawa dan virus ditambahkan ke sumur pertama. PBS dan cairan alantoat diresuspensi dengan mikropipet $\pm$ 5 kali, kemudian diambil 50 µl dan dipindahkan ke sumur 2 dan seterusnya hingga sumur ke-12. Langkah ini juga dilakukan untuk sumur yang hanya mengandung virus. Sebanyak 50 µl suspensi eritrosit ditambahkan ke semua sumuran,

plate dikocok hingga tercampur rata. Mikroplate dibiarkan dengan temperatur ruang selama 15-20 menit dan diamati aktivitas hemaglutinasinya (Diniatik et al., 2011).

2.3.10 Teknik Analisis Data

Data dianalisis dengan melihat titik akhir dan ditentukan sebagai titer hemaglutinasi cairan alantois. Titik akhir adalah jumlah pengenceran tertinggi terkecil yang masih dapat menunjukkan reaksi hemaglutinasi. Pengamatan dilakukan di sumur lempeng mikro dan dihitung persentase penghambatannya.

Persamaan presentase penghambatan:

$$P = \frac{A-B}{A} \times 100\% \quad \dots(1)$$

P = persentase penghambat infeksi

A = jumlah titer pada telur ayam berembrio tanpa perlakuan senyawa (kelompok kontrol)

B = jumlah titer pada telur ayam berembrio dengan perlakuan senyawa (kelompok perlakuan)

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides*)

Hasil dari proses ekstraksi daun Bandotan (*Ageratum conyzoides*) menggunakan etanol menghasilkan ekstrak kental sebanyak 8 gram.

Tabel 1. Pengamatan Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Bandotan

Pengamatan	Hasil
Bobot bawang putih	200 gram
Bobot ekstrak kental hasil maserasi	8,22 gram
Rendemen	4,11%

Tabel. 2 Uji Organoleptis Eksrak Etanol Daun Bandotan

Parameter	Hasil
Bentuk ekstrak	Kental
Bau	Khas Daun
Warna	Hijau Kehitaman

Proses ekstraksi bertujuan untuk menarik kandungan kimia dalam suatu tanaman. Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides*) mengandung minyak atsiri dan kandungan senyawa lainnya yang tidak stabil akan pemanasan. Metode maserasi dilakukan karena dapat digunakan untuk senyawa yang bersifat termostabil (Harborne, 1996). Pada penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut dalam ekstraksi. Pelarut yang digunakan didasarkan pada kemampuan melarutkan kandungan kimia sehingga dalam pemilihan cairan pelarut harus dipertimbangkan sesuai syarat kefarmasian (*Pharmaceutical grade*) (Depkes RI, 2000). Etanol merupakan pelarut yang memiliki sifat polar karena etanol termasuk alkohol primer dengan 1 gugus hidroksil dan gugus alkil yaitu etil etanol sehingga dapat membentuk ikatan hydrogen dengan air (Loekitowati, 2003).

Dalam proses ekstraksi daun bandotan (*Ageratum conyzoides*), dilakukan penguapan menggunakan *rotary evaporatory* agar pelarut yang tertinggal dalam ekstrak dapat menghilang. Rotary evaporator dapat menghilangkan komponen yang mudah menguap dengan cara vakum dan rotasi. Komponen kemudian dikondensasikan. Ekstrak disimpan dalam botol kaca yang dilapisi aluminium foil di dalam suhu ruang atau di dalam lemari pendingin. Stabilitas ekstrak yang disimpan pada suhu 4oC atau 21oC menunjukkan hasil yang lebih baik daripada penyimpanan dalam suhu ruang (Mehdizadeh et al., 2017).

3.2 Inokulasi virus dan injeksi senyawa

Uji aktivitas virus Newcastle Disease dilakukan pada TAB berumur 9-11 hari yang diperoleh dari perternakan di Sragen. TAB yang digunakan merupakan TAB berusia 9 hari karena sudah terdapat perkembangan embrio, adanya cairan alantois dan pembuluh darah mulai berkembang. Semakin tua usia embrio, maka akan terjadi perkembangan embrio yang semakin besar sehingga ruang cairan alantois akan menyusut sehingga pada usia 11 hari sudah mulai menyusut (Poultry Hub, 2022). Telur ayam berembrio dipilih sebagai media penelitian karena mudah diperoleh, relatif bebas dari mikroorganisme patogen, dan peka terhadap infeksi virus ND (Ayu and Kencana, 2017).

Rute dan umur embrio ditentukan oleh karakteristik dan sifat virus terhadap membran yang berada dalam telur (Burlenson et al., 1992). Cairan alantois merupakan media yang sesuai untuk perkembangan virus Newcastle (Fidyah et al., 2015). Selain

itu inokulasi virus melalui rute alantois termasuk aman karena tidak menimbulkan banyak kematian pada embrio (Murtini et al., 2006). Inokulasi virus dan injeksi senyawa jalur alantois akan menyebabkan senyawa tersebut berdifusi menuju cairan amnion dan diserap oleh embrio melalui trakea sehingga meminimalkan efek toksik dari senyawa (Jochemsen and Jeurissen, 2002). Berdasarkan pengamatan keadaan embrio setelah inokulasi selama 3x24 jam, tidak terdapat kematian embrio pada ketiga konsentrasi dan kontrol virus.

Tabel 3. Pengamatan kematian embrio setelah inokulasi virus ND dan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun bandotan.

Kelompok Perlakuan		Kematian Embrio				% Kematian
		0	2	4	7	
		jam	4 jam	8 jam	2 jam	
Konsentrasi 1 µg/mL		0	0	0	0	0%
		/3	/3	/3	/3	
Konsentrasi 10 µg/mL		0	0	0	0	0%
		/3	/3	/3	/3	
Konsentrasi 100 µg/mL		0	0	0	0	0%
		/3	/3	/3	/3	
Kontrol virus		0	0	0	0	0%
		/3	/3	/3	/3	

Pada penelitian ini virus yang digunakan dalam penelitian adalah vaksin virus aktif Medivac ND La Sota. Vaksin ND La Sota merupakan vaksin yang berisi virus Newcastle aktif strain lentogenik sehingga tidak menyebabkan kematian dalam waktu kurang dari 90 jam (Abdisa and Tagesu, 2017). Virus ND memiliki karakteristik peka terhadap panas sehingga akan mati pada suhu 50°C, tetapi dapat bertahan pada suhu 37°C selama 1 minggu (Pudjiatmoko et al., 2014). Hal tersebutlah yang menjadi dasar sebagai pemilihan suhu dan tempat yang optimal agar virus ND dapat berkembang dengan baik. Pada penelitian ini juga digunakan antibiotik untuk mencegah kontaminasi yang dapat mengganggu hasil uji antivirus. Kombinasi antibiotik ampicilin dan streptomisin digunakan karena ampicilin aktif terhadap bakteri gram positif, sedangkan streptomisin aktif terhadap bakteri gram negatif. Harapannya,

dengan menggunakan kombinasi tersebut dapat mencegah kemungkinan munculnya kontaminasi dari berbagai jenis bakteri. Sehingga dari data diatas menghasilkan bahwa TAB yang telah di inkubasi dengan suhu 37°C setelah inokulasi dalam waktu 3x24 jam tidak menyebabkan kematian embrio.

3.3 Hasil Uji Hemaglutinasi

Virus Newcastle memiliki protein neurominidase yang dapat membantu pelepasan virus dari sel inang dan mempengaruhi waktu yang dibutuhkan virus untuk mengelusi eritrosit (Pudjiatmoko et al., 2014). Apabila tidak terdapat virus, maka eritrosit akan mengalami presipitasi akibat gaya berat yang akan membentuk suatu dot atau titik merah pada sumuran. Namun,, adanya virus akan mengakibatkan penggumpalan eritrosit yang mengarah pada pembentukan lattice atau kekeruhan karena terdapat interaksi protein hemaglutinin dari virus dengan eritrosit (Ryu, 2017). Interaksi ikatan antara eritrosit dengan virus berlangsung sementara. Oleh karena itu, terdapat waktu optimum inkubasi plat uji hemaglutinasi yaitu pada rentang 15-25 menit (Diniatik et al., 2011).

Tabel 4. Efek perbedaan penggunaan larutan DMSO 100% dan DMSO 5% terhadap adanya kontaminasi pada pertumbuhan virus dalam percobaan

Efek perbedaan penggunaan larutan DMSO 100% dan DMSO 5% terhadap adanya kontaminasi pada pertumbuhan virus dalam percobaan	
Newcastle Disease Virus yang ditambahkan larutan DMSO 100% (pada percobaan kedua)	Newcastle Disease Virus yang ditambahkan larutan DMSO 5% (pada percobaan pertama)
Tidak ada kontaminasi	Adanya kontaminasi

Perbandingan hasil uji hemaglutinasi dengan perbedaan larutan seri konsentrasi menghasilkan faktor pengaruh kegagalan pada perlakuan pertama dengan menggunakan DMSO 5%. Didasarkan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa virus yang ditambahkan ke dalam larutan DMSO (dimetil sulfoksida) 5% telah terkontaminasi. Tidak ada kontaminasi virus yang ditambahkan ke dalam larutan 100% DMSO (dimethyl sulfoxide). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan 5% DMSO (dimethyl sulfoxide) sebagai pelarut bereaksi terhadap perubahan struktur yang menyebabkan pembusukan pada telur sehingga dalam pengambilan cairan sulit karena semua isi

didalam telur berwarna sangat keruh, sedangkan penggunaan 100% DMSO sebagai pelarut tidak menyebabkan pembusukan pada telur. Kemudian, penggunaan DMSO 100% sebagai pelarut dan juga tidak memiliki aktivitas antivirus. Data tersebut didukung dari beberapa penelitian yang menunjukkan tidak adanya penghambatan terhadap proliferasi virus Avian Influenza maupun virus ND (Johari et al., 2012; Kang et al., 2017; Sornpet et al., 2017). Oleh karena itu, pelarut DMSO tidak berpotensi dalam mengganggu aktivitas antivirus yang dihasilkan oleh senyawa sintesis.

Tabel 5. Hasil Uji Hemaglutinasi pada Kelompok 1 dan 2

Perla kuan	Sumuran ke-												
											0	1	2
Perla kuan Virus ND + 1μg/ mL													
Perla kuan Virus ND + 10μg/ mL													

Keterangan :

X : terjadi hemaglutinasi

● : tidak terjadi hemaglutinasi

Tabel 6. Hasil Uji Hemaglutinasi Pada kelompok 3

Perlakuan	Sumuran ke-												
											0	1	2
Perlakuan Virus ND + 100µg/ mL													

[illegible]

Keterangan :

X : terjadi hemaglutinasi

● : tidak terjadi hemaglutinasi

Berdasarkan hasil percobaan kedua pada Tabel 5 dan 6, menunjukkan bahwa konsentrasi 1 µg/ml dan 10 µg/ml tidak memiliki aktivitas hemaglutinasi. Hasil pengujian pada Tabel 6 menunjukkan aktivitas penghambatan palsu pada 100 µg/mL karena yang dihasilkan tidak terlalu jelas. Hal ini karena sel darah merah yang digunakan sudah tidak segar sehingga menyebabkan penggumpalan darah. Untuk mencegah eritrosit rusak, perlu mengumpulkan eritrosit langsung dari ayam yang disembelih. Kemudian tambahkan EDTA ke sel darah merah segar dan segera lakukan sentrifugasi darah. Selanjutnya, dilakukan perlakuan lagi pada konsentrasi 100 µg/mL dengan menggunakan eritrosit yang segar menunjukkan tidak ada terjadinya dot sehingga tidak ada penghambatan aktivitas hemaglutinasi.

Tabel. 7 Hasil Titer daya hambat antivirus ekstrak etanol daun bandotan

Replikasi	Hasil titer daya hambat pada perlakuan		
	100µg/ mL	10µg/ mL	1µg/ mL
I	2^{12}	2^{12}	2^{12}
II	2^{12}	2^{12}	2^{12}
III	2^{12}	2^{12}	2^{12}

Tabel 8 Hasil persentase daya hamabat antivirus ekstrak etanol daun bandotan

Replikasi	Hasil titer daya hambat pada perlakuan		
	100µg/ mL	10µg/ mL	1µg/ mL
I	0%	0%	0%
II	0%	0%	0%
III	0%	0%	0%

Secara khusus, penggunaan daun Bandotan (*Ageratum conyzoides*) sebagai antivirus *Newcastle disease* dapat diketahui dengan menguji ekstrak tumbuhan yang mencegah pertumbuhan virus. Hal tersebut terlihat dari hasil titer yang diperoleh pada

Tabel 7 menunjukkan bahwa ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) tidak memiliki aktivitas antivirus terhadap *Newcastle disease*. Titer virus hemaglutinasi dihitung dengan melihat *end point* dari masing-masing kelompok. Rata-rata jumlah titer pada kelompok 1, 2, dan 3 adalah 2^{12} . Sehingga pada hasil dari Tabel 7 dapat dimanfaatkan untuk menghitung persen inhibisi pada Tabel 8. Dari perhitungan pada Tabel 8 terlihat konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL dan 100 µg / mL mencapai 0% di semua salinan, oleh karena itu tidak mungkin untuk mengetahui apakah hasilnya efektif atau tidak seperti yang terlihat. tidak ada penghambatan virus penyakit *Newcastle disease*.

Virus *Newcastle disease* termasuk *family Paramyxovirid* yang mengandung sejumlah virus yang menyebabkan penyakit saluran pernapasan pada manusia (Simoes, 2010). Tidak ada vaksin berlisensi atau pengobatan antivirus yang efektif yang tersedia untuk virus ini (Carillo *et. al*, 2012) (Moss Wj, 2012) (Parker, 2006). *Paramyxovirus* merupakan avian pneumovirus (AMPV) yang terdapat di unggas yang diusulkan dari HMPV, dan ada di avian *Newcastle disease* virus (NDV) (Goebel, 2007). Sehingga pada data diatas, penelitian ini, dilakukan penambahan perlakuan kontrol positif pada percobaan ketiga. Kontrol positif yang digunakan adalah antivirus Favipiravir. Favipiravir (T-705; 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamine) adalah turunan pirazina yang telah menunjukkan aktivitas antivirus yang kuat terhadap beberapa virus RNA (Middleton, 2012).Enzim inang intraseluler bekerja pada T-705, mengubahnya menjadi bentuk aktifnya, T-705-4-ribofuranosyl-5-triphosphate (T-705RTP). T-705 saat ini dalam pengembangan klinis sebagai penghambat virus influenz. Virus influenzer termasuk *family Paramyxovirid* (Naesens, 2013).

Hasil percobaan ketiga pada perlakuan seri konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg / mL dan kontrol positif menggunakan antivirus favipiravir mengalami kesulitan saat pembacaan hasil uji hemaglutinasi. Faktor pada perlakuan kontrol positif antivirus favipiravir mengalami kegagalan dipengaruhi oleh ketidakmurnian obat yang digunakan. Oleh karena itu, obat favipiravir diganti dengan obat antivirus yang lain seperti ribavirin. Namun, pengujian obat ribavirin mengalami kendala berupa kesulitan untuk mendapatkan obat tersebut di wilayah Surakarta. Sehingga

dalam penelitian ini, untuk kontrol positif tidak bisa digunakan untuk perbandingan dengan hasil uji hemaglutinasi pada konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg / mL.

Faktor-faktor lain terjadi penghambatan pada penelitian ini, yaitu pada kandungan bercak daun Bandotan (*Ageratum conyzoides*) dengan konsentrasi rendah ekstrak daun Bandotan (*Ageratum conyzoides*) tidak memiliki efek antivirus. Lama penyimpanan dan suhu penyimpanan juga dapat mempengaruhi hasil. Pada ekstrak daun bandotan penyimpanan yang dilakukan pada suhu ruang 26- 28 karena semakin rendah suhu penyimpanan, maka ada kecenderungan kadar air semakin besar (Asagar dan Rhayu, 2014) dan pada lama penyimpanan akan sangat berpengaruh terhadap ekstrak daun bandotan karena semakin lama penyimpanan maka semakin banyak meningkatkan aktivitas mikroorganisme yang pada akhirnya mengakibatkan kebusukan atau kegagalan (kusuma, 2017). Sehingga berdasarkan hal tersebut, hal ini sesuai dengan literatur hasil penelitiannya oleh Mengkido et al. (2019) yang menemukan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides*), daya hambatnya semakin besar. Penelitian ini semakin sedikit menghambat atau bahkan sama sekali tidak bisa menghambat pertumbuhannya. Dengan begitu virus ini tumbuh dan berkembang biak sebanyak mungkin.

4. PENUTUP

Hasil penelitian tentang efek antivirus ekstrak etanol daun Bandotani (*Ageratum conyzoides*) tidak menunjukkan aktivitas antivirus yang baik terhadap virus *Newcastle disease* karena beberapa faktor seperti lama penyimpanan dan suhu.

DAFTAR PUSTAKA

- Achuwa, S. N. (2006). *Uji Daya Antiviral Ekstrak Kloroform Daun Bandotan (Ageratum conyzoides Lour) terhadap Infeksi Virus Newcastle Disease (ND) pada telur Ayam Berembrio*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Alexander, D. J., Aldous, E. W., & Fuller, C. M. (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathology*, 41(4), 329–335. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.697991>
- Ashraf, A., Ashraf, M. M., Rafiqe, A., Aslam, B., Galani, S., Zafar, S., Asad, F., Asghar, R. D., Akram, S., Ahmed, H., Shah, S. M. A., & Asif, R. (2017). In vivo antiviral potential of Glycyrrhiza glabra extract against Newcastle disease virus. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(2), 567–572.

- Ayu G. and Kencana Y., 2017, Modul Training Cara Mengisolasi Virus Danmengidentifikasi, Denpasar, pp. 13–21.
- Bamidele, O., Akinnuga, A. M., Anyakudo, M. M. C., Ojo, O. A., Ojo, G. B., Olorunfemi, J. O., & Johnson, O. P. (2010). Haemostatic effect of methanolic leaf extract of *Ageratum conyzoides* in albino rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(20), 2075–2079.
- Burleson, Thomas, & Danny. (1992). *Virology, a laboratory manual*. Academic Press.
- Carrillo-Santistev P, Lopalco PL. 2012. Measles still spreads in Europe: who is responsible for the failure to vaccinate Clin MicrobiolInfect 18(Suppl 5):S50–S56. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03982.x>.
- Dewi, dkk. 2007. Deteksi Virus avian Influenza Subtipe H5 pada Kucing jalanan (*Felis silvestris catus*) di Wilayah Kota Bandung. Bandung: FKH Universitas Airlangga.
- Diniatik, Kusuma, A. M., & Purwaningrum, O. (2011). Uji Aktivitas Antivirus Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum* Ruitz & Pav) Terhadap Virus Newcastle Disease (Nd) Dan Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. 08(01), 51–70.
- Egi, & Dianiatic. (2010). Aktivitas Antivirus Ekstrak Etanol Daun Bnadotan (*Ageratum conyzoides* L.) Terhadap Virus Newcastle Disease Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis.
- Fitrawati, F., Haryadi Wibowo, M., Amanu, S., Sutrisno, B., Kedokteran Hewan, F., Gadjah Mada, U., & Veteriner, S. (2017). Isolasi dan Identifikasi Egg Drop Syndrome Virus dengan Uji Hemaglutinasi dan Hemaglutinasi Inhibisi Isolation and Identification of Egg Drop Syndrome Virus with Hemagglutination and Hemagglutination Tests 1 1 1 1. *Jurnal Sain Veteriner*, 33(1), 59–68.
- Ganar, K., Das, M., Sinha, S., & Kumar, S. (2014). Newcastle disease virus: Current status and our understanding. *Virus Research*, 184, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.016>
- Goebel SJ, Taylor J, Barr BC, Kiehn TE, Castro-Malaspina HR, Hedvat CV, Rush-Wilson KA, Kelly CD, Davis SW, Samsonoff WA, Hurst KR, Behr MJ, Masters PS. 2007. Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. *J Virol* 81:12709–12714. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01406-07>.
- Harianingsih, Wulandari R., Harliyanto C. and Andiani C.N., 2017, Identifikasi GC-MS Ekstrak Minyak Atsiri dari Sereh Wangi (*Cymbopogon winterianus*) Menggunakan Pelarut Metanol, *Techno*, 18(1), 23-27.
- Jin, Y. H., Choi, J. G., Cho, W. K., & Ma, J. Y. (2017). Ethanolic extract of *Melia fructus* has anti-influenza A virus activity by affecting viral entry and viral RNA polymerase. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 2–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00476>
- Kasrina, K., Zukmadini, A. Y., Laily, F. A. B., & Rahmi, S. (2021). Medicinal Plants

- Diversity in Traditional Treatment of Rejang Ethnic Communities in Rejang Lebong Regency as a Resource for Learning Plant Taxonomy. *Proceedings of the International Conference on Educational Sciences and Teacher Profession (ICETeP 2020)*, 532(532), 275–282. <https://doi.org/10.2991/assehr.k.210227.048>
- Kotta, J. C., Lestari, A. B. S., Candrasari, D. S., & Hariono, M. (2020). Medicinal Effect, in Silico Bioactivity Prediction, and Pharmaceutical Formulation of *Ageratum conyzoides* L.: A Review. *Scientifica*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6420909>
- Kusuma & Zaky. (2005). *Tumbuhan Liar Berkhasiat Obat*. Agromedia Pustaka.
- Mengkido, Meisi., Orryani Lambui., & Wahyu Harso. (2019). Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aerus*. Sulawesi Tengah. Universitas Tadulako.
- Moss WJ, Griffin DE. 2012. Measles. *Lancet* 379:153–164. [http://dx.doi.org/10.1016/S01406736\(10\)62352-5](http://dx.doi.org/10.1016/S01406736(10)62352-5).
- MS, Middleton D, McCall B, Field H, Wang LF. 2012. Hendra virus: an emerging paramyxovirus in Australia. *Lancet Infect Dis* 12:799–807. [http://dx.doi.org/10.1016/S14733099\(12\)701585](http://dx.doi.org/10.1016/S14733099(12)701585)
- Nair H, Simoes EA, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JS, Feikin DR, Mackenzie GA, Moisi JC, Roca A, Baggett HC, Zaman SM, Singleton RJ, Lucero MG, Chandran A, Gentile A, Cohen C, Krishnan A, Bhutta ZA, Arguedas A, Clara AW, Andrade AL, Ope M, Ruvinsky RO, Hortal M, McCracken JP, Madhi SA, Bruce N, Qazi SA, Morris SS, El Arifeen S, Weber MW, Scott JA, Brooks WA, Breiman RF, Campbell H, Severe Acute Lower Respiratory Infections Working Group. 2013. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet* 381:1380–1390. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61901-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61901-1)
- Naesens L, Guddat LW, Keough DT, van Kuilenburg AB, Meijer J, Vande Voorde J, Balzarini J. 2013. Role of human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in activation of the antiviral agent T-705 (favipiravir). *Mol Pharmacol* 84:615–629. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.113.087247>
- Setyasari R., 2007, Efek Ekstrak Etanol Rimpang Temu Mangga (*Curcuma mangga* Val.) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. dan Virus Newcastle Disease, Terdapat di: <http://eprint.ums.ac.id/id/eprint/16878>.
- Parker AA, Staggs W, Dayan GH, Ortega-Sanchez IR, Rota PA, Lowe L, Boardman P, Teclaw R, Graves C, LeBaron CW. 2006. Implications of a 2005 measles outbreak in Indiana for sustained elimination of measles in the United States. *N Engl J Med* 355:447–455. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa060775>