

UJI AKTIVITAS ANTIVIRUS EKSTRAK ETANOL DAUN KATUK (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) DENGAN MODEL NEWCASTLE DISEASE

Annisa Nur Kumala, Azis Saifudin

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta,

Abstrak

Virus adalah unit biologi parasite obligat yang berukuran mikroskopik dan bersifat pathogen. Beberapa kasus yang disebabkan karena infeksi virus dapat menyebabkan penyakit akut bahkan kematian terhadap manusia. Daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) merupakan tanaman yang banyak dan mudah dijumpai di Indonesia. Beberapa senyawa flavonoid yang ada dalam daun katuk dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antivirus seperti kaempferol dan kuersetin. Penelitian ini bertujuan untuk melihat aktivitas antivirus ekstrak etanol daun katuk pada model virus *Newcastle Disease*. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Media yang digunakan untuk penelitian ini yaitu 12 TAB usia 9-11 hari dan dibagi 4 kelompok yaitu kontrol virus dan 3 kelompok perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL. Uji Hemaglutinasi digunakan untuk menentukan jumlah titer virus dengan bahan uji cairan alantois. Hasil uji menunjukkan ekstrak etanol daun katuk tidak memiliki aktivitas antivirus terhadap virus Newcastle disease yang ditandai dengan tidak terbentuknya tanda dot merah di tengah sumuran. Persentase daya hambat yang dimiliki ketiga konsentrasi tersebut sama yaitu sebesar 0%. Hasil identifikasi senyawa flavonoid ekstrak daun katuk secara kualitatif menunjukkan hasil positif

Kata Kunci: *Sauropus androgynus*, *Newcastle disease*, *antivirus*, *flavonoid*

Abstract

Viruses are obligate parasitic biological units that are microscopic in size and are pathogenic. Some cases caused by viral infections can cause acute illness and even death in humans. Katuk leaves (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) are a plant that is abundant and easy to find in Indonesia. Some of the flavonoid compounds present in katuk leaves are reported to have antiviral activity such as kaempferol and quercetin. This study aims to look at the antiviral activity of the ethanol extract of katuk leaves in the Newcastle Disease virus model. The extraction process uses the maceration method with 70% ethanol solvent. The media used for this study were 12 TAB aged 9-11 days and were divided into 4 groups, namely the virus control and 3 extract treatment groups with concentrations of 1, 10 and 100 µg/mL. Hemagglutination test is used to determine the amount of virus titer with allantoic liquid test material. The test results showed that the ethanol extract of katuk leaves did not have antiviral activity against the Newcastle disease virus which was indicated by the absence of a red dot in the middle of the well. The percentage of inhibitory power possessed by the three concentrations is the same were 0%. The qualitative results of the identification of the flavonoid compounds of katuk leaf extract showed positive results

Keywords: *Sauropus androgynus*, *Newcastle disease*, *antiviral*, *flavonoid*

1. PENDAHULUAN

Virus adalah unit biologi parasit obligat yang berukuran mikroskopik dan bersifat pathogen. Disebut parasit obligat karena virus hanya bisa bereplikasi di dalam sel inang (Priastomo et al., 2021). Beberapa kasus yang disebabkan karena infeksi virus dapat menyebabkan penyakit akut bahkan kematian terhadap manusia. Selain itu, dapat menimbulkan dampak yang besar pada berbagai aspek. Infeksi virus ini tidak hanya menyerang manusia, hewan dan tumbuhan dapat terinfeksi oleh virus selama sel masih hidup. Contohnya yaitu virus dari famili *Orthomyxoviridae* yaitu virus *Influenza tipe A subtype H5N1* yang menyebabkan flu burung, *Newcastle disease* yang disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus type-1* dari famili *Paramyxoviridae* dan penyakit Corona yang beberapa tahun belakang ini sempat mewabah disebabkan oleh *Sars-CoV-2* dari famili *Coronaviridae* (Acheson & Wiley, 2011; Ariandra, 2021; Frisa & Elfidasari, 2018). Contoh virus penyebab penyakit diatas termasuk dalam virus RNA untai tunggal (Acheson & Wiley, 2011). Saat ini, masih belum ditemukan obat yang efektif dalam menekan angka kematian dan meminimalisir klinis buruk akibat infeksi ini.

Di Indonesia, daun katuk dengan nama latin *Sauropus androgynus* (L) Merr dapat dengan mudah dijumpai. Daun katuk mengandung vitamin, mineral, dan beberapa metabolit sekunder. Vitamin yang banyak ditemukan adalah vitamin A dan D. Beberapa senyawa bioaktif yang terkandung di dalam daun katuk yaitu alkaloid, flavonoid, fenol, terpenoid dan glikosida (Padmavathi et al (1990) dalam Fikri & Purnama, 2020). Senyawa flavonoid yang banyak ditemukan pada daun katuk adalah kaempferol dan kuersetin (Eng Khoo et al., 2015). Sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan Andarwulan et al., (2010), Senyawa flavonoid yang ditemukan pada daun katuk yaitu kaempferol sebesar $138 \pm 5,8$; kuersetin sebesar $4,50 \pm 0,22$; mirisetin sebesar $< 0,00002$; luetolin sebesar $< 0,006$; dan apigenin sebesar $< 0,03$.

Penelitian tentang ekstrak daun katuk sebagai antivirus masih belum banyak dilakukan. Namun, beberapa senyawa flavonoid yang ada dalam daun katuk dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antivirus. Penelitian yang dilakukan oleh Wu et al., (2016) menunjukkan bahwa kuarsetin memberikan efek inhibitor kuat pada strain virus yang berbeda dari nilai Virus Influenza A dengan uji in vitro. IC₅₀ kuersetin terhadap (H1N1) strain A/Puerto Rico/8/34, (H1N1) A/FM-1/47/1, dan

(H3N2) A/Aichi/2/68 strain influenza-A masing-masing adalah $7,756 \pm 1,097$, $6,225 \pm 0,467$, dan $2,738 \pm 1,931$ g/ml. Hasil penelitian dari Tsai et al., (2011) mengungkapkan senyawa kaempferol yang didapatkan dari *Sigma Chemical* (St. Louis, USA) dapat menurunkan aktivitas virus EV-A71 dengan mekanisme mengganggu replikasi virus dan menghambat aktivitas IRES (tempat masuknya ribosom internal). Berdasarkan uraian diatas, peneliti tertarik melakukan penelitian untuk melihat aktivitas antivirus ekstrak etanol daun katuk menggunakan model virus RNA yaitu virus *Newcastle Disease*.

2. METODE

2.1 Alat Dan Bahan

Alat yang dipersiapkan antara lain timbangan analitik (Ohaus), *rotary evaporator* (Heidolph Laborota 4000 Efficient), *waterbath* (Memmert), oven (Memmert), LAF (*Laminar Air Flow*), Inkubator telur, sentrifugator (Hettich Mikro 200 R), spuit injeksi 1 ml (OneMed), dan *microplate* dasar U (Iwaki).

Bahan yang digunakan adalah daun katuk diperoleh dari dari Joyotakan, Kecamatan Serengan, Surakarta dan dipanen pada Juni 2022, telur ayam berembrio berumur 9 hari yang diperoleh dari peternakan di daerah Simo, Boyolali, Jawa Tengah, etanol 70%, DMSO (*Dimethyl sulfoxide*), eritrosit ayam, EDTA, larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) steril, larutan WFI (*Water for Injection*), vaksin ND Medivac La Sota, antibiotik ampisilin (*Ampicillin sodium salt Sigma*), dan antibiotik streptomisin (*Streptomycin sulfate salt Sigma*).

2.2 Jalannya Penelitian

2.2.1 Penyiapan Simplisia Daun Katuk

Daun yang sudah terkumpul, kotoran yang menempel pada daun dihilangkan dengan air bersih. Setelah itu daun katuk diletakkan di tampah dan dijemur dibawah sinar matahari ditutupi dengan kain hitam. Daun katuk yang sudah kering dimasukkan ke blender untuk dilembutkan dan ditimbang bobotnya (Diniatik et al., 2012; Wahyu et al., 2017).

2.2.2 Ekstraksi

Proses ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. 200 gram serbuk daun katuk direndam dengan pelarut etanol 70% sampai terendam. Lama maserasi

yaitu 2 x 24 jam. Setelah 2 hari maserasi, dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain penyaring selanjutnya diremaserasi selama 1 x 24 jam. Setelah proses maserasi selama 3 hari, dipisahkan ekstrak dengan ampasnya dengan corong buncher dan diuapkan filtratnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak kental (Diniatik et al., 2012; Wahyu et al., 2017). Selanjutnya ekstrak dikentalkan di *waterbath* selama < 1 hari.

2.2.3 Identifikasi Senyawa Flavonoid

2.2.3.1 Identifikasi dengan NaOH 10%

2 tetes sampel dimasukkan ke tabung dan ditambahkan 2-4 tetes NaOH 10%. Hasil positifnya yaitu warna larutan berubah menjadi kuning sampai coklat (Kusnadi, 2017).

2.2.3.2 Identifikasi dengan H₂SO₄ pekat

2 tetes sampel diisikan ke dalam tabung reaksi, kemudian 2-4 tetes larutan H₂SO₄ pekat ditetaskan. Hasil uji dapat dilihat dari adanya perubahan warna sampel menjadi merah bata sampai coklat kehitaman (Kusnadi, 2017).

2.2.4 Persiapan Telur Uji

Telur uji yang digunakan adalah telur ayam berembrio yang telah dieramkan 9 hari sebanyak 12 buah yang didapat dari daerah Simo, Boyolali, Jawa Tengah. Telur uji mempunyai bentuk dan ukuran yang sama. Diperiksa telur uji untuk memastikan embrio tetap hidup dengan menggunakan senter atau lampu penerangan lainnya. Letakkan ujung runcing telur di bagian atas agar rongga udara dapat terlihat jelas. Tandai bagian kepala embrio dan batas rongga udara dengan spidol dan tempatkan di inkubator pada suhu 37°C (Diniatik et al., 2012).

2.2.5 Persiapan Virus Nd Dan Antibiotik

Virus didapatkan dari vaksin aktif Medicav ND La Sota. Vaksin Medicav ND La Sota dosis 500 didapatkan dari *poultry shop* yang terdapat di Gentan, Sukoharjo, Jawa Tengah. Vaksin La Sota dosis 500 dilarutkan ke dalam 10 mL PBS steril, 1 mL vaksin mengandung 50 dosis. Sebanyak 0,3mL antibiotik ditambahkan ke dalam suspensi vaksin untuk menghindari adanya kontaminasi bakteri (Ashraf et al., 2017). Antibiotik dibuat dengan cara melarutkan masing-masing 1000 mg antibiotik ampisilin ke dalam 5 mL WFI dan 1000 mg streptomisin ke dalam 5mL WFI. Persiapan virus dilakukan dalam LAF. Setelah dicampurkan, suspensi virus diinkubasi dengan suhu 37°C selama 1 jam.

2.2.6 Persiapan Sampel Ekstrak Etanol Daun Katuk

Melarutkan 10 mg ekstrak kental etanol daun katuk dalam 10 mL DMSO 100%. Kemudian dibuat 3 larutan konsentrasi yaitu 1, 10 dan 100µg/mL dengan melarutkan masing-masing 1, 10, dan 100µL larutan stok ke dalam 1mL DMSO 100%.

2.2.7 Inokulasi Virus Newcastle Disease

Hal pertama yang dilakukan adalah mencuci dan mensterilkan alat-alat yang akan digunakan untuk penelitian. Setelah dicuci, alat-alat gelas dibungkus dengan kertas untuk disterilkan dengan oven pada suhu 170°C selama 60 menit dan yellow tip, white tip, blue tip disterilkan menggunakan autoklaf dengan 120°C selama 20 menit (Solichati et al., 2010). Untuk PBS steril disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Cangkang telur yang mengandung rongga udara disterilkan dengan alkohol 70% dan lubangi area tersebut dengan paku payung dekat dengan pembuluh darah dan rongga udara. Kemudian sampel yang sudah diinjeksikan dengan variasi konsentrasi diinokulasikan ke dalam ruang alantois. Virus diinokulasikan ke dalam ruang alantois dengan spuit injeksi 1 mL. Lubang ditutup menggunakan selotip dan pada suhu 37°C selama 3 hari telur diinkubasi (Diniatik et al., 2012)

Sebanyak 12 TAB berumur 9 hari (masing-masing 3 telur) dibagi dalam kelompok kontrol virus dan kelompok uji:

- 1.) Kelompok I diinjeksikan 0,2 mL ekstrak daun katuk konsentrasi 1 µg/mL dan diinjeksikan 0,2 mL virus ND yang sudah diberi antibiotik
- 2.) Kelompok II diinjeksikan 0,2 mL ekstrak daun katuk konsentrasi 10 µg/mL dan diinjeksikan 0,2 mL virus ND yang sudah diberi antibiotik
- 3.) Kelompok III diinjeksikan 0,2 mL ekstrak daun katuk konsentrasi 100 µg/mL dan diinjeksikan 0,2 mL virus ND yang sudah diberi antibiotik
- 4.) Kelompok IV diinjeksikan 0,2 mL virus ND yang sudah diberi antibiotik (Kontrol virus)

2.2.8 Pengambilan Eritrosit Ayam

Darah ayam diperoleh dari tempat pemotongan ayam yang ada di Kartasura. Darah ayam segar diambil menggunakan spuit injeksi sebanyak 20 mL ditambahkan larutan EDTA sebanyak 20 mg. Darah ayam dimasukkan ke dalam PCR tube 1,5 mL dan dengan kecepatan 3000 rpm/menit disentrifugasi selama ¼ jam agar eritrosit dan

plasmanya terpisah. Cuci endapan dengan PBS steril diulangi sampai 3 kali hingga diperoleh konsentrasi eritrosit 100%. Pembuatan suspensi eritrosit 1% dilakukan dengan perbandingan eritrosit dengan PBS yaitu 1:99 atau 1 tetes eritrosit ditambah 99 tetes PBS (Diniatik et al., 2012; Fitrawati. et al., 2015)

2.2.9 Pengambilan Cairan Alantois

Selotip yang digunakan untuk menutup lubang cangkang telur dibuka menggunakan pinset. Cangkang telur dibuka agak lebar pada bagian rongga udara dengan menggunakan pinset sampai cairan allantois pada bagian atas terlihat dengan jelas dan cairan alantois diambil menggunakan spuit injeksi 1 mL. Cairan disimpan pada flakon dan diberi label.

2.2.10 Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dilakukan untuk menghitung titer virus ND menggunakan mikroplat dasar U 96 sumuran. Sebanyak 50 μ L larutan PBS steril dimasukkan ke dalam semua lubang sumuran. Kemudian dimasukkan sebanyak 50 μ L cairan alantois yang sudah diberi perlakuan yaitu lubang sumuran baris A-C untuk kelompok I dan D-F untuk kelompok II pada microplate pertama, baris A-C untuk kelompok III dan D-F untuk kontrol virus (kelompok IV) pada microplate kedua. Dimasukkan pada lubang sumuran no.1 dan dilakukan pengenceran berseri sampai no.12 dengan cara meresuspensi sumur no.1 sebanyak 3 kali lalu memindahkan sebanyak 50 μ L mL cairan dari sumuran no.1 ke dalam sumuran no. 2, sumuran no. 2 ke no. 3, sampai sumuran no. 12. Ditambahkan 50 μ L suspensi eritrosit ayam 1% ke semua lubang sumuran. Digoyangkan sedikit untuk mencampur dan didiamkan selama 15 menit. Jika tidak terbentuk endapan eritrosit ayam, maka hasil uji HA negatif.

2.3 Analisis Data

Titer virus cairan alantois dihitung dan persentase penghambatan dihitung dengan sistem hemaglutinasi yang ada pada sumuran mikroplat. Berikut rumus persentase penghambatan:

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

Keterangan:

P = persentasi penghambatan virus

A = jumlah titer pada kelompok kontrol virus

B = jumlah titer pada kelompok TAB dengan perlakuan variasi konsentrasi ekstrak daun katuk

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Penyiapan Simplisia Daun Katuk

Daun katuk yang didapatkan dibersihkan dengan air sampai kotoran hilang. Daun katuk dipilih yang memiliki kondisi yang bagus dan segar untuk selanjutnya ditata di tampah yang cukup besar dan ditutupi kain hitam saat dikeringkan di bawah sinar matahari agar daun tidak terkena sinar matahari langsung. Agar pemanasan dapat merata ke seluruh bagian, daun yang ada di tampah disusun agar tidak bertumpang tindih. Apabila daun sudah mudah dihancurkan dengan tangan, proses pengeringan dapat dihentikan. Pengeringan bertujuan untuk mencegah adanya pertumbuhan mikroba atau jamur serta mencegah senyawa aktif terurai oleh reaksi enzimatis dan proses hidrolisis karena tingginya kandungan air sehingga penyimpanan simplisia dapat bertahan lama. Proses selanjutnya, simplisia di haluskan menggunakan blender agar luas permukaan simplisia dan kontak permukaan partikel dengan penyari semakin besar sehingga penyarian lebih optimal. Setelah itu, bobot serbuk ditimbang dan didapatkan bobot serbuk daun katuk sebesar 200 g.

3.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah langkah pertama untuk memisahkan produk natural dari bahan bakunya menggunakan pelarut pilihan. Pemilihan pelarut untuk ekstraksi sangat penting. Pelarut yang biasa digunakan untuk mengekstraksi metabolit sekunder yaitu metanol, etanol 70%, dan etanol 96% (Saifudin, 2014). Keuntungan memilih pelarut ini adalah karena senyawa aktif dapat ditarik lebih banyak dengan etanol dibanding dengan jenis pelarut organik lainnya, pada senyawa flavonoid yang polar akan cenderung tertarik lebih banyak, cenderung aman dan tidak toksik (Hasanah & Novian, 2020). Metode ekstraksi yang dipilih untuk penelitian ini yaitu maserasi. Metode ini merupakan metode yang paling sederhana karena mudah dilakukan. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Pengadukan dan remaserasi dilakukan untuk meningkatkan efektifitas ekstraksi. Selama 3 x 24 jam, maserasi dilakukan. Selama 2 hari, 200 g serbuk daun katuk direndam dengan etanol 70% sebanyak 2L. Kemudian, ampas dari proses maserasi

diremaserasi lagi dengan 800 mL etanol 70%. Sari yang diperoleh, dievaporasi dengan *evaporator rotary* selama 4 jam dengan mengatur suhu 60° C untuk menguapkan larutan penyari yang digunakan. Dan setelah itu di waterbath selama 9 jam untuk menghilangkan kandungan air sehingga ekstrak menjadi kental. Ekstrak ditimbang dan didapat bobotnya sebesar 77 g.



Gambar 1. Ekstrak Kental Daun Katuk

3.3 Hasil Identifikasi Senyawa Flavonoid

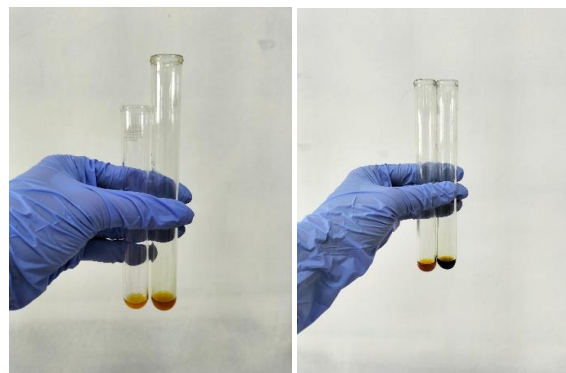
Tahap awal suatu penelitian yaitu identifikasi senyawa fitokimia atau skrining fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang senyawa yang terdapat dalam tanaman yang sedang diteliti (Sholihah et al., 2020). Setiap golongan dari metabolit sekunder yang diidentifikasi memiliki ciri khas saat direaksikan dengan larutan pereaksi. Pada penelitian ini, uji fitokimia digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa flavonoid pada daun katuk. Hasil positif uji reaksi warna ini adalah adanya perubahan warna pada sampel yang diuji. Hasil pengamatan uji fitokimia pada ekstrak daun katuk sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil Identifikasi Senyawa Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid	Hasil	Sumber
Ekstrak daun katuk + NaOH 10%	Coklat tua	kuning sampai coklat (Kusnadi, 2017)
Ekstrak daun katuk + H ₂ SO ₄ pekat	Coklat kehitaman	merah tua - coklat kehitaman (Kusnadi, 2017)

Berdasarkan tabel 2, hasil sampel yang telah ditetesi NaOH 10% warna larutan berubah menjadi coklat. Hal ini terjadi karena penguraian senyawa kristin oleh NaOH 10% sehingga menjadi asetofenon yang berwarna kuning karena ikatan pada struktur isoprena terputus. Hasil positifnya yaitu warna larutan berubah dari kuning sampai coklat (Asih dalam Kusnadi, 2017). Uji warna ini menunjukkan ekstrak daun katuk mengandung senyawa flavonoid.

Uji identifikasi kedua yaitu perubahan warna pada sampel menjadi coklat kehitaman terjadi setelah ditetesi H₂SO₄ pekat. Perubahan warna terjadi karena adanya reaksi redoks antara senyawa flavonoid dan H₂SO₄ pekat sehingga membentuk senyawa kompleks yang menghasilkan warna merah tua sampai coklat kehitaman (Kusnadi, 2017). Hasil ini membuktikan bahwa ekstrak daun katuk positif mengandung senyawa flavonoid.



(a)

(b)

Gambar 2. Hasil Identifikasi Senyawa Flavonoid (a) dengan reagen NaOH 10% (b) dengan reagen H₂SO₄ pekat

3.4 Inokulasi Virus Newcastle Disease

Pada penelitian ini TAB usia 9 hari digunakan sebagai media inokulasi virus. Telur ayam berembrio diperoleh dari peternakan PT. Nutfah Unggul Inti Makmur daerah Simo, Boyolali, Jawa Tengah. Telur berembrio telah lama digunakan sebagai media isolasi virus seperti *Avian Influenza*, virus ND dan Campal (Aziz et al., 2019; Murtini et al., 2006). TAB dipilih sebagai media karena mudah didapat, biaya relatif lebih murah, peka terhadap virus ND dan mudah dikerjakan di laboratorium. Jumlah telur ayam berembrio yang digunakan 12 telur yang dibagi menjadi 4 kelompok uji yaitu 3 kelompok perlakuan yang masing-masing dibuat konsentrasi 1 µg/ml (kelompok I), 10 µg/ml (kelompok II), dan 100 µg/ml (kelompok III) dan 1

kelompok kontrol virus (kelompok IV) yang digunakan untuk mengetahui kemampuan replikasi virus.

Beberapa bagian telur ayam berembrio yang menjadi tempat inokulasi virus yaitu membran korioalantois, kantong merah telur, ruang alantois, dan ruang anionik (Capuccino and Natalie (1983) dalam Diniatik et al., 2012). Pada penelitian ini, inokulasi virus melalui rute ruang alantois. Ruang alantois dipilih karena rute ini tidak menyebabkan kematian pada embrio karena rute ini aman (Etches, 1996). Cairan alantois yang berada dalam ruang alantois menyerap kalsium dari cangkang untuk nutrisi pada embrio dan berperan sebagai organ pernapasan embrio (Kurniawan *et al.*, 2022).

Virus yang digunakan di dalam penelitian ini adalah vaksin ND Medicav La Sota. Virus diperoleh dari daerah Gentan, Sukoharjo. Bentuk vaksin berupa bentuk kering beku. Pada suhu $>50^{\circ}\text{C}$ virus ini tidak bisa bertahan hidup, tetapi tahan pada suhu 37°C , suhu 22°C - 28°C bertahan selama 2 bulan dan pada kulkas beku selama berbulan-bulan. Virus ND La Sota ini termasuk ke dalam strain lentogenik yang merupakan bentuk virus ND yang digunakan sebagai vaksin hidup dan mengakibatkan kematian embrio > 90 jam (Hewajuli & Dharmayanti, 2011; Pudjiatmoko et al., 2014; Purnasari et al., 2017). Inkubasi telur pada penelitian ini adalah 3×24 jam dan di *candling* setiap hari untuk mengetahui keadaan embrionya. Sejalan dengan pernyataan dari (Susanti et al (2007) dan Fitriawati. et al., (2015), selama 3×24 jam telur diinkubasi, apabila pada hari ketiga embrio telur masih hidup maka telur dikeluarkan dari mesin tetas, disimpan dalam lemari es selama 1 hari dan dilakukan uji HA.

Keadaan embrio yang sudah diberi perlakuan dikontrol dan diamati setiap 24, 48, dan 72 jam. Berdasarkan pengamatan, pada tabel 3 menunjukkan bahwa pada 24 jam pertama terdapat satu kematian embrio pada replikasi 3 kelompok senyawa 1 $\mu\text{g/ml}$ dan selama 72 jam terdapat 1 kematian embrio pada replikasi 1 kelompok senyawa 10 $\mu\text{g/ml}$. total terdapat 2 kematian embrio pada penelitian ini.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Keadaan Embrio Pascainokulasi

Kelompok	Kematian embrio				% kematian
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam	

Kontrol virus	0/3	0/3	0/3	0/3	0%
Kelompok I 1 ug/ml	0/3	1/3	1/3	1/3	33,33 %
Kelompok II 10 ug/ml	0/3	0/3	0/3	1/3	33,33 %
Kelompok III 100 ug/ml	0/3	0/3	0/3	0/3	0%

Berdasarkan tabel 3, persentase kematian embrio setiap kelompok yaitu kelompok I (1 µg/ml) sebesar 33,33%; kelompok II (10 µg/ml) sebesar 33,33%; kelompok III (100 µg/ml) sebesar 0%, dan kelompok IV (kontrol virus) sebesar 0%. Kematian embrio pada kelompok senyawa uji 1 µg/ml kemungkinan karena mengalami kontaminasi. Berdasarkan pengamatan, kontaminasi ditandai dengan telur berbau busuk. Dan pada kelompok senyawa uji 10 µg/ml kemungkinan embrio mati karena pembuluh darah ayam pecah saat inokulasi akibat kesalahan penyuntikkan.

Pada penelitian ini, kematian embrio yang disebabkan oleh kontaminasi disebabkan karena adanya kontak udara pada telur karena penutup lubang cangkang tidak tertutup dengan sempurna. Selain itu, kontaminasi dapat disebabkan oleh bakteri. Pada umumnya, bakteri yang mengkontaminasi telur adalah bakteri jenis *Salmonella sp.* Pada proses produksi dan pascaproduksi, jika kebersihan dan sanitasi di peternakan serta penyimpanan kurang diperhatikan, cemaran *Salmonella spp.* dapat terjadi pada telur (Nugroho *et al.*, 2015). Untuk mencegah adanya kontaminasi dari bakteri, diberi campuran antibiotik pada larutan stok ekstrak dan larutan virus. Kombinasi dari antibiotik streptomisin dan ampisilin digunakan karena ampisilin aktif terhadap bakteri gram positif, sedangkan streptomisin aktif terhadap bakteri gram negatif. Selain diberikan antibiotik, antiseptik Rodalon digunakan untuk membersihkan cangkang telur dari kotoran. Antiseptik ini aman digunakan karena biasa digunakan untuk penyemprotan kandang unggas dan digunakan selama

mengikuti petunjuk yang terdapat pada kemasan. Dan pada kelompok II (10 µg/ml) kemungkinan kematian embrio disebabkan karena pecahnya pembuluh darah ditandai dengan cairan alantois yang berwarna agak merah. Cairan alantois yang baik adalah berwarna jernih dan cair.



Gambar 3. Warna Cairan Alantois Kelompok II (10 µg/ml)

3.5 Hasil Uji Hemaglutinasi

Uji yang digunakan untuk penelitian ini adalah uji hemaglutinasi. Uji hemaglutinasi merupakan salah satu uji serologi untuk mengidentifikasi virus sebagai penyebab suatu penyakit. Prinsip uji ini adalah adanya ikatan antara eritrosit ayam dan protein virus yang disebut hemagglutinin sehingga pada sumuran akan terlihat keruh karena darah teraglutinasi dan saat partikel virus tidak ada, sel darah merah akan mengendap ke dasar sumur yang menimbulkan titik berwarna merah yang berbentuk kerucut (Burlison et al., 1992; Ryu, 2017). Hasil positif dari uji hemaglutinasi adalah adanya darah yang turun ke dasar sumuran (tanda dot merah ditengah *microplate*) pada hasil percobaan yang membuktikan bahwa eritrosit tidak mengalami aglutinasi akibat adanya interaksi antara virus *Newcastle*.


Uji hemaglutinasi memerlukan indikator untuk pembacaan hasil yaitu eritrosit ayam segar dengan konsentrasi 1%. Segera darah ayam yang diambil dimasukkan ke dalam *tube* yang sudah diisi dengan EDTA. EDTA berfungsi sebagai antikoagulan darah. Selanjutnya, darah disentrifugasi dengan alat sentrifugator, diatur waktunya selama 15 menit dan kecepatan 3000 rpm. Setelah terbagi menjadi 2 bagian, supernatan dibuang dan endapan eritrosit dicuci menggunakan PBS steril

sebanyak 3 kali dan disentrifugasi selama 1 menit pada 3000 rpm, langkah tersebut diulang sampai 3 kali hingga didapat suspensi eritrosit ayam 100%. Suspensi eritrosit 1% dibuat dengan perbandingan eritrosit : PBS yaitu 1:99 atau 1 tetes eritrosit ditambah 99 tetes PBS (Fitrawati. et al., 2015).

Pada uji hemaglutinasi, tujuan dibuatnya 3 kelompok perlakuan dengan variasi konsentrasi yang berbeda untuk melihat seberapa besarnya daya hambat ekstrak terhadap virus. Hasil uji hemaglutinasi keempat kelompok dapat diamati pada gambar 4, 5, dan 6. Ditunjukkan pada gambar 3 hasil kelompok I dan II, sumuran berwarna keruh dan tidak terdapat tanda dot merah di tengah sumuran. Begitu juga dengan kelompok III dan IV (gambar 4) sumuran berwarna keruh dan tanda dot merah tidak terlihat, warna sumuran yang keruh menandakan bahwa eritrosit dengan protein yang dimiliki oleh virus aktif berikatan sehingga darah teraglutinasi. Pada penelitian ini tidak digunakan kontrol positif karena saat pembacaan hasil uji hemaglutinasi kontrol positif tidak bekerja sehingga tidak dapat dibandingkan dengan hasil uji hemaglutinasi pada 3 kelompok perlakuan ekstrak. Dari data tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun katuk pada 3 konsentrasi yang berbeda tidak dapat menghambat aglutinasi darah dengan virus *Newcastle disease*.

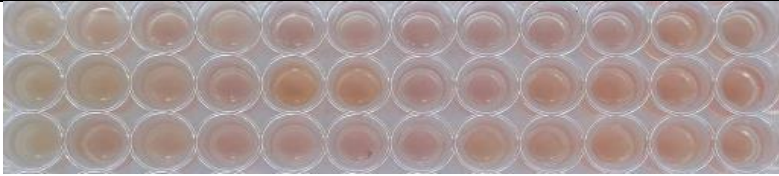

Pada gambar 6 juga terdapat hasil uji hemaglutinasi kontrol pelarut. Pelarut yang digunakan untuk membuat 3 larutan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL menggunakan pelarut DMSO 100%. Pelarut DMSO dipilih karena tidak menunjukkan penghambatan proliferasi virus *Newcastle Disease* (Kang Y. et al, 2017). Berdasarkan hasil pengamatan, DMSO tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan virus *Newcastle* yang dapat dilihat dengan tidak terbentuknya tanda dot merah pada tengah *microplate*.

Tabel 3. Hasil Uji Hemaglutinasi Kelompok I (1 µg/mL) dan kelompok II (10 µg/mL)


Perlakuan	Replikasi	Sumuran											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kelompok 1 1 µg/mL	1												
	2												
	3												

Kelompok 2 10 µg/mL	1	
	2	
	3	
Keterangan :		
<input type="checkbox"/> : tidak terjadi hemaglutinasi <input checked="" type="checkbox"/> : terjadi hemaglutinasi		

Tabel 4. Hasil Uji Hemaglutinasi Kelompok III (100 µg/mL) dan Kelompok IV (Kontrol Virus)

Perlakuan	Replikasi	Sumuran											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kelompok III 100 µg/mL	1												
	2												
	3												
Kelompok IV Kontrol virus	1												
	2												
	3												
Keterangan :		<input type="checkbox"/> : tidak terjadi hemaglutinasi <input checked="" type="checkbox"/> : terjadi hemaglutinasi											

Gambar 5. Hasil Uji Hemaglutinasi DMSO 100% (Kontrol Pelarut)

Perlakuan	Replikasi	Sumuran											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrol pelarut	1												
	2												
	3												
Keterangan :		<input type="checkbox"/> : tidak terjadi hemaglutinasi <input checked="" type="checkbox"/> : terjadi hemaglutinasi											

Jumlah titer virus pada setiap kelompok dirangkum pada tabel 4. Titer virus dihitung dari melihat sumuran terakhir pada *end point* (nomor yang besar) yang menunjukkan positif hemaglutinasi . Apabila titer hemaglutinasi semakin tinggi maka konsentrasi virus yang dapat mengaglutinasi sel darah merah semakin tinggi (OIE (2021) dalam Kurniawan et al., 2022). Hasil rata-rata titer virus yang diperoleh pada kontrol pelarut, kontrol virus dan 3 kelompok perlakuan masing-masing adalah 4.096 titer.

Tabel 6. Hasil Perhitungan Uji Hemaglutinasi

TAB	Titer HA				
	Kontrol Pelarut	Kontrol virus	Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Katuk ($\mu\text{g/ml}$)		
	DMSO		1	10	100
1	2^{12}	2^{12}	2^{12}	2^{12}	2^{12}
2	2^{12}	2^{12}	2^{12}	2^{12}	2^{12}
3	2^{12}	2^{12}	2^{12}	2^{12}	2^{12}

Daya hambat ekstrak etanol daun katuk dapat dihitung menggunakan rumus persen penghambatan yang membutuhkan data perbandingan selisih titer kontrol virus dan titer senyawa sintesis dengan titer kontrol virus. Pada tabel 6 menunjukkan bahwa rata-rata persen penghambatan ekstrak etanol daun katuk pada konsentrasi 1, 10, dan 100 $\mu\text{g/mL}$ di bawah 50% yaitu sebesar 0%. Dibandingkan dengan hasil penelitian dari Diniatik et al., (2012), daya hambat ekstrak etanol daun sirih merah pada konsentrasi 1, 10, dan 100 $\mu\text{g/mL}$ secara berurutan yaitu 50%, 91,67%, dan 94,792%. Apabila nilai rata-rata penghambatan suatu senyawa lebih dari 50% maka dapat disimpulkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas antivirus. Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan bahwa rata-rata persen penghambatan ekstrak etanol daun katuk tidak dapat menghambat hemaglutinasi darah terhadap virus *Newcastle disease*.

Tabel 7. Persen Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Katuk

Kelompok perlakuan	Persen penghambatan			Rata-rata % penghambatan
	TAB ke-			
	1	2	3	

1 µg/ml	0%	0%	0%	0%
10 µg/ml	0%	0%	0%	0%
100 µg/ml	0%	0%	0%	0%
Kontrol virus	0%	0%	0%	0%

Potensi ekstrak etanol daun katuk dalam menghambat virus dapat diketahui dengan menggunakan parameter IC_{50} . Nilai Inhibition Concentration 50 % merupakan nilai hambatan perkembangan virus sebesar 50 %. Perhitungan IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi linier antara log konsentrasi vs probit, untuk harga probit didapat dari konversi rerata persentase penghambatan (Sulistyani *et al.*, 2009). Berdasarkan hasil pengamatan, pada *microplate* tidak terbentuk endapan darah (tanda dot merah) dan dilihat pada dari tabel 6, rata-rata daya hambat sebesar 0% menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun katuk tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap virus *Newcastle disease* sehingga perhitungan IC_{50} tidak dapat dihitung.

Menurut Syarurachman dalam Diniatik *et al.*, (2012), secara umum, mekanisme kerja antivirus dalam menghambat pertumbuhan virus yaitu dengan mengganggu mRNA virus, menghambat DNA polimerasi virus, menghambat pembentukan kapsid dari virus, menghambat sintesis DNA virus, dan menghambat penetrasi atau pelepasan selubung virus. Senyawa flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas antivirus. Hasil penelitian Wu *et al.*, (2016) menunjukkan bahwa efek inhibitor kuat dihasilkan dari kuersetin pada strain virus yang berbeda dari nilai Virus Influenza A dengan uji *in vitro*. Terbukti kuersetin yang diisolasi dari ekstrak tanaman *Epimedium koreanum* Nakai dapat menginduksi sekresi IFN tipe 1, mengurangi replikasi HSV, *Newcastle disease*, VSV *in vitro* serta influenza A subtype (H1N1, H5N2, H7N3, dan H9N2) secara *in vivo* sedangkan kaempferol yang diperoleh dari Sigma Chemical (St. Louis, USA) dapat mengganggu replikasi virus dan menghambat aktivitas IRES pada virus EV 71 yang merupakan virus RNA untai tunggal (Cho, W.K., Weeratunga, P. Lee, B.H., 2015; Tsai *et al.*, 2011). Aktivitas antivirus dari senyawa flavonoid dapat menghambat virus *Newcastle*

disease. Namun, dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa tidak terlihat adanya aktivitas penghambatan terhadap virus *Newcastle disease*.

Ketidakberhasilan penelitian dapat terjadi karena penurunan kadar senyawa flavonoid di dalam ekstrak daun katuk yang membuat aktivitas antivirus tidak efektif terhadap virus *Newcastle disease*. Beberapa faktor yang mempengaruhi yaitu pelarut untuk ekstraksi, suhu dan lama penyimpanan. Pemilihan pelarut untuk ekstraksi sangat penting karena pelarut yang digunakan diharapkan dapat menarik senyawa aktif dari bahan yang diekstrak. Menurut Ibrahim et al. (2015) perlu diperhatikan peningkatan suhu ekstraksi karena suhu tinggi dan lama waktu saat ekstraksi menyebabkan senyawa-senyawa hilang karena penguapan. Senyawa bahan alam seperti flavonoid tidak dapat bertahan pada suhu diatas 50° C sehingga struktur mengalami perubahan. Penyimpanan flavonoid pada suhu kamar dapat menguap dan penyimpanan dalam waktu lama dapat menyebabkan senyawa aktif flavonoid dapat teroksidasi (Gunawan dalam Handini, 2018). Selain faktor diatas, tidak bekerjanya kontrol positif terhadap virus tidak dapat menggambarkan efek dari ekstrak etanol daun katuk yang diuji terhadap NDV sehingga belum bisa disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun katuk tidak memiliki aktivitas antivirus terhadap virus *Newcastle Disease*.

4. PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak etanol daun katuk tidak dapat menghambat aglutinasi darah terhadap virus *Newcastle disease*. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya tanda dot warna merah ditengah *microplate* pada semua kelompok perlakuan dan rata-rata daya hambatnya yaitu 0% sehingga nilai IC₅₀ ekstrak daun katuk tidak dapat dihitung. Ketidakberhasilan pada penelitian terjadi karena penurunan kadar senyawa flavonoid yang membuat aktivitas antivirus tidak efektif terhadap virus *Newcastle disease*. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melihat kadar senyawa flavonoid yang terdapat dalam daun katuk dan penentuan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas antivirus pada virus *Newcastle disease*. Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dapat dilakukan penggantian pelarut dan validasi ulang uji hemaglutinasi menggunakan kontrol positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Acheson, N. H., & Wiley, J. (2011). *Fundamentals of Molecular Virology* (2nd ed.). John Wiley & Sons, Inc. <http://www.wiley>
- Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D. A., Bolling, B., & Wijaya, H. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, *121*(4), 1231–1235. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.01.033>
- Ariandra, A. (2021). Covid-19: Epidemiologi, Virologi, Penularan, Gejala Klinis, Diagnosa, Tatalaksana, Faktor Resiko Dan Pencegahan. *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, *3*(November), 653–660. <http://jurnal.globalhealthsciencegroup.com/index.php/JPPP/article/download/83/65>
- Aziz, G. N., Suwarno, S., Praja, R. N., Rahmahani, J., Wibawati, P. A., & Fikri, F. (2019). Identifikasi Perkembangan Virus Infectious Bronchitis Isolat Lokal Dan Massachusetts Pada Cairan Allantois TAB Dengan Indirect Fluorescence Antibody Technique. *Jurnal Medik Veteriner*, *2*(1), 18. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol2.iss1.2019.18-23>
- Cho, W.K., Weeratunga, P. Lee, B.H., et al. (2015). Epimedium koreanum Nakai Displays Broad Spectrum of Antiviral Activity in Vitro and in Vivo by Inducing Cellular Antiviral State. *Viruses*, *7*, 352–377.
- Diniatik, D., Kusuma, A. M., & Purwaningrum, O. (2012). Uji Aktivitas Antivirus EKSRUK ETANOL DAUN SIRIH MERAH (Piper crocatum Ruitz & Pav) TERHADAP VIRUS NEWCASTLE DISEASE (ND) DAN PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPISNYA. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, *9*(01). <https://doi.org/10.30595/PJI.V9I1.691>
- Eng Khoo, H., Azlan, A., & Ismail, A. (2015). Article in The Natural Products Journal. *The Natural Products Journal*, *5*(2), 115–123. <https://doi.org/10.2174/221031550502150702142028>
- F., F., H.W., M., A., S., & S., B. (2015). Isolasi dan Identifikasi Egg Drop Syndrome Virus dengan Uji Hemaglutinasi dan Hemaglutinasi Inhibisi. *Jurnal Sain Veteriner*, *33* (1)(1), 59–68.
- Fikri, F., & Purnama, M. T. E. (2020). Pharmacology and Phytochemistry Overview on Sauropus androgynous. *Systematic Reviews in Pharmacy*, *11*(6), 124–128. <https://doi.org/10.31838/SRP.2020.6.20>
- Frisa, A., & Elfidasari, D. (2018). Seroprevalensi Virus Avian Influenza SubTipe H5N1 Pada Unggas Domestik Peliharaan Masyarakat di Kawasan Cagar Alam Pulau Dua Serang Provinsi Banten. *JURNAL AL-AZHAR INDONESIA SERI SAINS DAN TEKNOLOGI*, *4*(2), 74. <https://doi.org/10.36722/sst.v4i2.263>
- Handini, A. (2018). Pengaruh Perubahan Kadar Flavonoid pada Penyimpanan Ekstrak Etanol Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) terhadap Potensinya Sebagai Insektisida Terhadap Lalat Rumah (*Musca domestica*) dengan Metode Semprot.

In [Http://Repository.Ub.Ac.Id/](http://Repository.Ub.Ac.Id/).

- Hasanah, N., & Novian, D. R. (2020). Analisis Ekstrak Etanol Buah Labu Kuning (*Cucurbita moschata* D.). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 9(1), 54–59.
- Hewajuli, D. A., & Dharmayanti, N. L. P. I. (2011). Patogenitas Virus Newcastle Disease Pada Ayam. *WARTAZOA*, 21(2), 72–80.
- Ibrahim, A. M., Sriherfyna, F. H., & Yunianta. (2015). Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Sifat Kimia dan Fisik pada Pembuatan Minuman Sari JAhe Merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) dengan Kombinasi Penambahan Madu sebagai Pemanis. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 3(2), 530–541.
- Kang Y., Yuan R., Zhao X., Xiang B., Gao S., Gao P., Dai X., Feng M., Li Y., Xie P., Li Y., Gao X., and R. T. (2017). Transient Activation of the P13K Akt Pathway Promotes Newcastle Disease Virus Replication and Enhances Anti-apoptotic Signaling Responses. *Oncotarget*, 8(14), 23551–23563.
- Kurniawan, F. R., Arsana, I. N., & Adiputra, I. G. K. (2022). Titer Hemaglutinasi dan Kematian Embrio pada Telur Specific Antibody Negative (SAN) dengan Usia yang Berbeda Saat Inokulasi Virus Avian Influenza. *Jurnal Peternakan*, 19(1), 49. <https://doi.org/10.24014/jupet.v19i1.15101>
- Kusnadi, D. E. . (2017). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Ekstrak Daun Seledri (*apium graveolens* L.) dengan Metode Refluks. *Pancasakti Science Education Journal*, 2(9), 56–67.
- Murtini, S., Murwani, R., Satrija, F., & Malole, M. B. M. (2006). Penetapan Rute dan Dosis Inokulasi pada Telur Ayam Berembrio sebagai Media Uji Khasiat Ekstrak Benalu Teh (*Scurrula oortiana*). *JITV*, 11(2), 137–143.
- Nugroho, S., Purnawarman, T., & Indrawati, A. (2015). Deteksi Salmonella spp . pada Telur Ayam Konsumsi yang Dilalulintaskan melalui Pelabuhan Tenau Kupang. *Acta Veterina Indonesiana*, 3(1), 16–22.
- Priastomo, Y., Qurrota, A., Lestari, W., Rini, I. A., Kasasiah, A., Hutabarat, M., Argaheni, N. B., Yayasan, P., & Menulis, K. (2021). *Virologi* (J. Simarmata (ed.)). Yayasan Kita Menulis.
- Pudjiatmoko, Muhammad, S., Nurtanto, S., Lubis, N., Syafrison, Yulianti, S., N., D. K., Yohana, C. K., Setianingsih, E., Nurhidayah, Efendi, D., & Saudah, E. (2014). Manual Penyakit Unggas. In *Kementerian Pertanian*.
- Purnasari, M. E., Adi, A. A. A. M., & Winaya, I. B. O. (2017). Pengaruh Virus Newcastle Disease Isolat Virulen Terhadap Gambaran Histopatologi Otak dan Berat Embrio Ayam. *Indonesia Medicus Veterinus*, 6(2), 101–108. <https://doi.org/10.19087/imv.2017.6.2.101>
- Ryu, W.-S. (2017). Diagnosis and Methods. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, 47–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00004-7>
- Saifudin, A. (2014). *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik*

Pemurnian. Deepublish.

- Sholihah, M., Nurcahyo, H., & Febriyanti, R. (2020). Analisis Fitokimia dan Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L) dengan Berbagai Metode Pengeringan Simplisia. *Parapemikir: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 9(1), 1–5. <http://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/parapemikir>
- Solichati, E. L., Kusuma, A. M., & Diniatik, D. (2010). Aktivitas Antivirus Ekstrak Etanol Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) terhadap Virus Newcastle Disease Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 7(01). <https://doi.org/10.30595/PJI.V7I1.545>
- Sulistiyani, N., Azizah, I., & Kuswandi, M. (2009). Aktivitas antiviral ekstrak etanol biji srikaya (*Annona squamosa* terhadap virus newcastle disease pada telur ayam berembrio The antiviral activity of srikaya seed (*Annona squamosa* L.) ethanolic extract against newcastle disease virus in chicken embryo. *Majalah Farmasi Indonesia*, 20(2), 62–67.
- Tsai, F. J., Lin, C. W., Lai, C. C., Lan, Y. C., Lai, C. H., Hung, C. H., Hsueh, K. C., Lin, T. H., Chang, H. C., Wan, L., Sheu, J. J. C., & Lin, Y. J. (2011). Kaempferol inhibits enterovirus 71 replication and internal ribosome entry site (IRES) activity through FUBP and HNRP proteins. *Food Chemistry*, 128(2), 312–322. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.03.022>
- Wahyu, Y., Mulyani, T., Hidayat, D., & Fatimah, Y. (2017). EKSTRAK DAUN KATUK (*Sauropus androgynus* (L) Merr) SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis* Antibacterial Activity of (*Sauropus androgynus* (L) Merr) Extract Againsts *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus Epide*. *JFL Jurnal Farmasi Lampung*, 6(2), 46–55.
- Wu, W., Li, R., Li, X., He, J., Jiang, S., Liu, S., & Yang, J. (2016). Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Viruses*, 8(6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/v8010006>