

UJI AKTIVITAS ANTIVIRUS EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimi basilica f. citrate folium*) DENGAN TARGET VIRUS NEWCASTLE DISEASE

Septiana Fadhila Nurmianingsih*, Azis Saifudin,
Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta,

Abstrak

Daun kemangi (*Ocimi basilica f. citrate folium*) merupakan satu dari sekian banyak bahan alam yang diteliti kandungan dan kegunaanya. Tanaman ini dilansir memiliki manfaat mulai dari antiinflamasi, antivirus, dan antibakteri. Pemilihan model *Newcastle Disease* virus sebagai strategi dalam mencari agen antiviral COVID-19 dikarenakan keduanya merupakan virus RNA yang sama-sama menyerang sistem pernapasan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antivirus yang dikandung dari daun tanaman kemangi (*Ocimi basilica f. citrate folium*) terhadap agen virus pada model *Newcastle Disease*. Daun kemangi diekstraksi dengan metode maserasi. Hasil ekstrak diinokulasi ke allantois telur ayam berembrio (TAB) berumur 9-10 hari dan diinkubasi 3 hari. Sebanyak 16 telur dibagi menjadi 6 kelompok (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, kontrol positif senyawa antivirus *ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimide-5-carboxylate*, kontrol virus, dan kontrol negatif). Selama proses inkubasi, dilakukan pengecekan telur setiap hari guna mengamati kematian embrio. Pasca diinkubasi kembali selama 3 hari dilakukan uji hemaglutinasi. Hasil uji hemaglutinasi yang menunjukkan adanya aktivitas antivirus ditandai terbentuknya dot pada tengah sumuran mikrolat. Hasil penelitian aktivitas antivirus ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimi basilica f. citrate folium*) tidak menunjukkan aktivitas antivirus terhadap virus *Newcastle Disease* baik pada konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, maupun 100 µg/mL, sedangkan pada kontrol positif senyawa antivirus *ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimide-5-carboxylate* memiliki aktivitas antivirus sebesar 49,95% pada konsentrasi 100 µg/mL dan 99,89% pada konsentrasi 10 µg/mL.

Kata Kunci: Antivirus, *Newcastle Disease*, *Ocimum basilicum*, Daun Kemangi, Uji Hemaglutinasi.

Abstract

Basil leaves (*Ocimi basilica f. citrate folium*) are one of the many natural ingredients that have been researched for their contents and uses. This plant is reported to have benefits ranging from anti-inflammatory, antiviral and antibacterial. The *Newcastle Disease* virus model was chosen as a strategy in searching for an antiviral agent for COVID-19 because both are RNA viruses that both attack the respiratory system. This study aims to determine the antiviral activity contained in the leaves of the basil plant (*Ocimi basilica f. citrate folium*) against viral agents in the *Newcastle Disease* model. Basil leaves are extracted using the maceration method. The resulting extract was inoculated into the allantois of 9-10 day old embryonated chicken eggs (TAB) and incubated for 3 days. A total of 16 eggs were divided into 6 groups (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, positive control antiviral compound *ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1, 2,3,4-tetrahydropyrimide-5-carboxylate*, virus control, and negative control). During the incubation process, eggs are checked every day to observe embryo death. After incubation again for 3 days, a hemagglutination test was carried out. Hemagglutination test results showing antiviral activity were marked by the formation of a dot in the center of the microplate well. The results of research on the antiviral activity of the ethanol extract of

basil leaves (*Ocimi basilica f. citrate folium*) did not show antiviral activity against the Newcastle Disease virus at concentrations of 1 µg/mL, 10 µg/mL, or 100 µg/mL, whereas in the positive control the antiviral compound *ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimide-5-carboxylate* has antiviral activity of 49.95% at a concentration of 100 µg/mL and 99, 89% at a concentration of 10 µg/mL.

Keywords: Antivirus, Newcastle Disease, *Ocimum basilicum*, Sweet Basil Leaves.

1. PENDAHULUAN

Pemanfaatan antivirus berbasis produk bahan alam banyak diteliti dan dikembangkan hingga saat ini. Banyaknya keragaman tanaman dan rempah di Indonesia mendorong banyak penelitian terkait pemanfaatan pengobatan berbasis bahan alam termasuk sebagai agen antivirus. Daun tanaman kemangi menjadi salah satu bahan alam yang banyak diteliti kandungan dan kegunaannya. Komponen bioaktif minyak atsiri yang terkandung dalam tanaman kemangi meliputi monoterpenoid (*carvone*, *cineole*, *fenchone*, *geraniol*, *linalool*, *myrcene* dan *thujone*), seskuiterpenoid (*caryophyllene* dan *farnesol*), triterpenoid (asam ursolat) dan flavonoid (*apigenin*) (Duke, 2018). Dari banyaknya senyawa komponen tersebut, dalam sebuah penelitian menyebutkan komponen dengan aktivitas antivirus ditunjukkan pada asam ursolat, apigenin, dan linalool yang memiliki spectrum aktivitas antivirus yang luas (Chiang *et al.*, 2005). Ketiga senyawa tersebut memiliki beberapa aktivitas biologis seperti antiinflamasi, antivirus, dan antibakterial. Dalam beberapa penelitian mengungkapkan bahwa senyawa ini menghambat virus melalui siklus replikasinya dan mengeblok kerja protein virus. Asam ursolat menghambat *coxsackievirus* dan *enterovirus* pada proses infeksi dan replikasi virus dengan nilai EC₅₀ masing-masing sebesar 0,4 mg/L dan 0,5 mg/L (Chiang *et al.*, 2005). Senyawa apigenin daun kemangi dinilai efektif digunakan untuk *treatment* COVID-19 karena kemampuan anti-inflamatorinya dengan konsentrasi rendah 10 µg/mL (Zannella *et al.*, 2021). Selain itu pada senyawa linalool memiliki efek antivirus terhadap virus RNA penyebab bronchitis dengan koefisien korelasinya sebesar 0,636 (Drevinskas *et al.*, 2019).

Pada era pandemi COVID-19 hingga sekarang, berbagai pengobatan sangat pesat dikembangkan oleh para peneliti. Virus Corona penyebab COVID-19 merupakan virus tipe RNA yang menyerang jaringan paru-paru. Pemilihan model *Newcastle Disease* virus sebagai strategi dalam mencari agen antiviral Virus Corona dikarenakan keduanya merupakan virus RNA yang sama-sama menyerang sistem pernapasan. Virus *Newcastle Disease* menginfeksi sel target melalui pengikatan *glikoprotein hemagglutinin-neuraminidase* (HN) virus ke protein permukaan sel (Dortmans *et al.*, 2011). Berdasarkan uraian di atas, peneliti mencoba sebuah penelitian mengenai aktivitas antivirus yang dikandung dari daun tanaman kemangi (*Ocimi basilica f. citrate folium*) terhadap agen virus pada model *Newcastle Disease*.

2. METODE

2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain blender, *vacuum pump pompa*, *rotary evaporator*, neraca analitik, inkubator telur, senter *candling*, *vortex mixer*, mikroplat dasar U, spuit injeksi steril 1mL, flakon, pinset, paku kecil, solatip, mikropipet, *yellow tip*, *sentrifugator*, *eppendorf* 1,5 mL, LAF (*Laminar Air Flow*), oven, autoklaf, tabung reaksi, dan pipet tetes.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun kemangi yang didapat dari daerah Kartasura, TAB (telur ayam berembrio) umur 9-10 hari yang diperoleh dari peternakan di daerah Andong, Kab. Boyolali, Jawa Tengah, vaksin Medivac ND strain La Sota, etanol 96%, DMSO (*Dimethyl sulfoxide*), antibiotik ampicillin dan streptomisin, *water for injection*, PBS (*Phosphate buffer saline*) steril, EDTA (*Ethylene diamine tetra acetic acid*), eritrosit ayam, senyawa *ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate* yang diperoleh dari dosen Fakultas Farmasi UMS (apt. Ahmad Fauzi, M. Farm), serta bahan-bahan lainnya untuk uji fitokimia seperti amil alkohol, magnesias, HCl, reagen Meyer, FeCl₃ 5%, aquadest hangat, asam asetat anhidrat, dan asam sulfat.

2.3. Jalan Penelitian

2.3.1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman kemangi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2.3.2. Ekstraksi

Daun kemangi yang telah dipilah dan dibersihkan dikeringkan kurang lebih 5 hari. Daun kering yang didapat diblender untuk mendapatkan ukuran simplisia lebih kecil. Simplisia ditimbang sebanyak 150 gram dan dimaserasi dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:4 selama 1x24 jam. Hasil maserat divacum dan diremaserasi selama 1x24 jam (Kumalasari and Andiarna, 2020).

2.3.3. Skrining Fitokimia Ekstrak

Pemeriksaan alkaloid dilakukan menggunakan pereaksi Meyer. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Pemeriksaan flavonoid digunakan magnesias, amil alkohol, dan beberapa tetes HCl pekat. Reaksi positif ditandai pada lapisan berwarna kuning. Pemeriksaan kandungan terpenoid digunakan pereaksi asam asetat anhidrat dan asam sulfat. Reaksi positif ditandai dengan cincin coklat kekuningan. Pemeriksaan kandungan saponin digunakan penambahan asam klorida 2 N dan aquadest hangat pada sampel dan hasil positif ditandai dengan adanya busa yang stabil dalam 10 menit. Pemeriksaan kandungan tanin dilakukan dengan penambahan FeCl₃ 5% dan hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan biru hingga hitam kehijauan.

2.3.4. Preparasi Sampel

Larutan stok dibuat dengan menimbang ekstrak daun kemangi sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 10 mL DMSO, dan divortex selama 5 menit sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL yang homogen. Selanjutnya larutan seri konsentrasi dibuat dengan mengambil sebanyak 1 μ L, 10 μ L, dan 100 μ L larutan stok dan dilarutkan ad 1 mL DMSO, sehingga didapatkan seri konsentrasi masing-masing 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, dan 100 μ g/mL.

2.3.5. Preparasi Antibiotik

Antibiotik ampicillin dan streptomisin digunakan dengan masing-masing 1000 mg, kemudian dilarutkan masing-masing dalam 5 mL *water for injector* dan dicampurkan.

2.3.6. Preparasi Virus Newcastle Disease

Vaksin Medivac ND La Sota dosis 200 diperoleh dari Toko Pakan Hewan di Jl. Wimboharsono, Kec. Kartasura. Vaksin didapatkan dalam bentuk padat kering dan harus disimpan pada suhu kulkas -4°C. Setiap 50 dosis vaksin dilarutkan dalam 1 mL PBS steril, sehingga dalam dosis 200 dilarutkan dalam 4 mL PBS steril. Vaksin yang telah dilarutkan, ditambahkan 0,5 mL antibiotik untuk menghindari kontaminasi dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C untuk mengoptimalkan kerja antibiotik.

2.3.7. Preparasi Senyawa Ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate

Larutan stok dibuat dengan menimbang serbuk senyawa sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 10 mL DMSO, dan difortex selama 5 menit sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL yang homogen. Selanjutnya larutan seri konsentrasi dibuat dengan mengambil sebanyak 1 μ L, 10 μ L, dan 100 μ L larutan stok dan dilarutkan ad 1 mL DMSO, sehingga didapatkan seri konsentrasi masing-masing 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, dan 100 μ g/mL.

2.3.8. Persiapan Telur Uji

TAB (telur ayam berembrio) dengan ukuran dan bentuk kurang lebih sama diinkubasi pada inkubator bersuhu 37°C hingga berumur 9-10 hari. Sebelum diinokulasi, telur *dicandling*/disinari untuk memastikan fertilitasnya. Fertilitas dari embrio telur dilihat melalui adanya bintik hitam embrio dan berkembangnya jalur pembuluh darah (Mariani and Hamzani, 2021). Untuk mempermudah inokulasi, diberikan batas garis rongga udara dan titik pelubangan pada telur menggunakan pensil.

2.3.9. Inokulasi Sampel Dan Virus Ke Dalam Ruang Alantois Telur

Semua alat disterilisasi menggunakan oven pada temperatur 170°C selama 1 jam untuk alat yang tahan panas tinggi dan autoklaf pada temperatur 120°C selama 30 menit untuk alat yang tidak tahan panas tinggi. Perlakuan inokulasi TAB ini dilakukan pada LAF. Cangkang telur fertil disterilkan menggunakan kapas yang diberi alkohol 70%. Cangkang telur dilubangi bagian atas yang terdapat

rongga udara menggunakan paku kecil pada bagian yang telah ditandai sebelumnya. Sampel dan virus diinokulasi sesuai pembagian kelompok uji menggunakan spuit injeksi steril 1 mL secara vertical dan perlahan melalui lubang pada telur.

Kelompok uji yang digunakan pada penelitian ini dirincikan sebagai berikut:

1. Kelompok 1 : 0,2 mL ekstrak daun kemangi dengan konsentrasi 1 µg/mL + 0,2 mL suspensi virus yang diberi antibiotik
2. Kelompok 2 : 0,2 mL ekstrak daun kemangi dengan konsentrasi 10 µg/mL + 0,2 mL suspensi virus yang diberi antibiotik
3. Kelompok 3 : 0,2 mL ekstrak daun kemangi dengan konsentrasi 100 µg/mL + 0,2 mL suspensi virus yang diberi antibiotik
4. Kelompok kontrol positif : 0,2 mL larutan senyawa *ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimide-5-carboxylate* + 0,2 mL suspensi virus yang diberi antibiotik
5. Kelompok kontrol virus
6. Kelompok kontrol negatif : tanpa inokulasi

Setelah diinokulasi, lubang pada telur ditutup menggunakan solatip dengan rapat untuk mencegah kontaminasi masuk. Kemudian telur diinkubasi kembali selama 3x24 jam. Setelah 3 hari terinkubasi, telur dipindah ke kulkas 1x24 jam pada suhu 4-8°C untuk menghentikan semua reaksi dari perkembangan telur dan mempermudah pengambilan cairan allantois saat uji hemaglutinasi.

2.3.10. Preparasi Suspensi Eritrosit 1%

Eritrosit ayam diperoleh dari Pemotongan Ayam Moeslem di Jl. Duwet Raya, Mendungan, Kec. Kartasura. Darah ayam diletakkan pada toples kecil berisi larutan EDTA 20 mg sebagai antikoagulan (Rosidah dan Cahyo, 2018). Darah dimasukkan dalam *eppendorf* 1,5 mL dan di sentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan eritrosit dan plasma darah (supernatan). Supernatan dibuang dan eritrosit yang mengendap dicuci menggunakan PBS steril tiga kali agar didapatkan eritrosit 100%. Suspensi eritrosit 1% dibuat terhadap PBS steril atau 1 tetes eritrosit ditambahkan dengan 99 tetes PBS steril.

2.3.11. Pengambilan Cairan Allantois

Selatip yang melekat pada cangkang telur dibuka menggunakan pinset. Cangkang telur dibuka pada bagian rongga udara untuk mempermudah pengambilan cairan allantois. Cairan allantois diambil menggunakan spuit injeksi steril berukuran 1mL dan dimasukkan ke dalam flakon yang telah diberi label.

2.3.12. Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dilakukan menggunakan mikrotiter U 96 sumuran. 50 µL larutan PBS steril ditetaskan dalam semua sumuran. Selanjutnya 50 µL cairan allantois telur ditetaskan pada sumuran A, dilakukan pengenceran berseri dengan meresuspensi sumuran A1 sebanyak 3 kali dan dipindah setengahnya ke dalam sumuran A2. Sumuran A2 diresuspensi dengan cara yang sama hingga sumuran A12. Langkah sama dilakukan pada sumuran B dan seterusnya. Setelah semua allantois telur teresuspensi, ditetaskan 50 µL suspensi eritrosit 1% ke dalam semua sumuran. Mikrotiter digoyang secara perlahan selama 30 detik dan didiamkan 15-20 menit. Hasil positif daya hambat virus apabila terbentuk endapan titik eritrosit di tengah sumuran (Remontara *et al.*, 2022).

2.3.13. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan melihat titer virus ND berupa jumlah terkecil dari pengenceran tertinggi yang menunjukkan reaksi hemaglutinasi. Selanjutnya dihitung persentase daya hambat melalui rumus berikut:

$$P = \frac{(A-B)}{A}$$

Keterangan :

P = Persentase penghambat infeksi

A = Jumlah titer pada telur ayam berembrio tanpa perlakuan ekstrak etanol daun kemangi

B = Jumlah titer pada telur ayam berembrio dengan perlakuan ekstrak etanol daun kemangi

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan guna memastikan kebenaran simplisia dan menghindari kesalahan pengambilan sampel utama yang digunakan untuk uji antivirus. Tanaman kemangi diperoleh dari daerah Kartasura, Kab Sukoharjo. Determinasi tanaman ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Surakarta. Hasil dari determinasi tanaman menunjukkan bahwa sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah kemangi dengan nama ilmiah *Ocimum basilicum* L. *f. citratum* Back.

3.2 Ekstraksi Daun Kemangi

Tabel 1. Hasil Pengamatan Ekstraksi Ekstrak Etanol Daun Kemangi

Pengamatan	Hasil
Bobot simplisia daun kemangi	150 gram
Bobot ekstrak kental setelah diekstraksi	1,309 gram

Tabel 2. Uji Organoleptis Ekstrak Kental Daun Kemangi

Parameter	Hasil
Bentuk ekstrak	Kental
Bau	Khas daun kemangi
Warna	Hijau kehitaman

Proses ekstraksi dilakukan guna memisahkan senyawa target berupa bahan aktif dalam suatu tanaman. pemilihan simplisia sampel daun kemangi terlebih dahulu diblender guna didapatkan partikel yang lebih kecil sehingga memperluas permukaan ekstraksi dan lebih mengoptimalkan penarikan kandungan senyawa di dalamnya. Pemilihan suhu ekstraksi dan pelarut juga mempengaruhi kestabilan kandungan senyawa yang terdapat dalam sampel (Onyebuchi and Kavaz, 2020). Pada daun tanaman kemangi memiliki kandungan khas berupa minyak atsiri dan senyawa lainnya yang tidak stabil dalam pemanasan atau termolabil. Dalam penelitian ini digunakan metode maserasi yang bersifat termostabil dan pelarut etanol yang memiliki sifat luas mengisolasi senyawa organik bahan alam (Widyawati, 2017). Pembuatan ekstrak kental daun kemangi dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Alat ini bekerja dengan memisahkan uap pelarut yang berbentuk cairan dengan padatan ekstrak kental hasil maserasi. Penggunaan *rotary evaporator* ditujukan karena mampu mengatur suhu sesuai yang dikehendaki sehingga tidak merusak senyawa bahan alam yang terkandung dalam ekstrak.

Dari hasil ekstraksi daun kemangi menggunakan pelarut etanol dihasilkan ekstrak kental sebanyak 1,31 gram dari bobot awal simplisia 150 gram, sehingga didapatkan rendemen sebanyak 0,87% dengan warna hijau kehitaman dan bau khas daun kemangi yang tajam. Untuk menjaga kestabilan dan menghindari degradasi dari ekstrak daun kemangi disimpan dalam tube kecil dilapisi aluminium foil dan disimpan dalam suhu sejuk (Rahmawati, 2017).

3.3 Inokulasi Sampel Dan Virus

Tabel 3. Kematian Embrio Selama Masa Inkubasi Pasca Diinokulasi

Kelompok Perlakuan	Kematian Embrio Telur			% Kematian
	24 jam	48 jam	72 jam	
Konsentrasi 1 µg/mL	0/2	0/2	0/2	0%
Konsentrasi 10 µg/mL	0/2	0/2	0/2	0%
Konsentrasi 100 µg/mL	0/2	0/2	0/2	0%
Kontrol positif (senyawa antivirus)	0/4	0/4	0/4	0%
Kontrol virus	0/3	0/3	0/3	0%
Kontrol negatif	0/3	0/3	0/3	0%

Virus merupakan mikroorganisme yang bersifat intraseluler, artinya hanya dapat hidup didalam sel. Pemilihan media berupa telur ayam berembrio dipilih karena peka akan infeksi virus *Newcastle disease*, mudah diperoleh, mudah diberikan penanda dan perlakuan seperti menggunakan pensil untuk penanda, penetapan tanggal inokulasi, serta pengecekan telur menggunakan *candler*. Penentuan rute inokulasi melalui allantois telur dipilih karena kecil resiko kematian pada embrio akibat inokulasi (Kencana, 2017).

Inokulasi sampel dan virus dilakukan pada telur ayam berembrio (TAB) berusia 9-10 hari. Pada usia ini, ruang allantois telur ayam lebih luas dibandingkan pada usia 13 hari yang mulai menyusut dan mulai berkembang menjadi membrane korialantois. Pemilihan inokulasi pada usia telur lebih awal pada usia 6-8 hari dinilai belum siap dimasukkan dimasukkan virus karena organ embrio baru saja berkembang. Usia telur 9-10 hari dinilai tepat untuk pemilihan waktu dinokulasi karena sudah terdapat perkembangan embrio telur, cairan allantois dan pembuluh darah mulai berkembang pada usia tersebut (Kurniawan *et al.*, 2022). Tanda tersebut menjadi hal penentu apakah embrio dari telur fertil atau tidak saat *dicandling* menggunakan *candler egg*. Berdasarkan hasil pengamatan selama 3×24 jam pasca inokulasi, tidak menunjukkan kematian embrio kelima kelompok perlakuan. Kematian pada TAB dapat dilihat melalui cairan allantois yang dipanen berwarna merah. Hal ini menandakan bahwa ada kesalahan saat melakukan inokulasi . Posisi inokulasi yang tidak tepat merusak dan menembus pembuluh darah embrio sehingga membuat struktur TAB menjadi tercampur dan menyebabkan adanya kontaminasi. Penutupan lubang inokulasi menggunakan solatip yang tidak rapat juga mampu mendorong adanya kontaminasi oleh bakteri dan jamur (McGinnes *et al.*, 2006).

Pengamatan dan pengisolasian virus tidak dilakukan lebih dari 3×24 jam dikarenakan *Newcastle Disease* virus strain La Sota ini merupakan tipe virus lentogenik dimana akan membunuh embrio dalam waktu >90 jam (McGinnes *et al.*, 2006). Pada perlakuan ini digunakan kombinasi 2 antibiotik diberikan untuk mencegah infeksi sekunder dari bakteri. Antibiotik ampicilin aktif melawan bakteri gram positif, sedangkan antibiotik streptomisin aktif melawan bakteri gram negatif. Virus tidak memiliki kepekaan terhadap antibiotik sehingga penggunaan antibiotik tidak berpengaruh pada pertumbuhan virus (Kencana, 2017).

3.4 Uji Hemaglutinasi

Tabel 4. Hasil Uji Hemaglutinasi Ekstrak Etanol Daun Kemangi

Perlakuan	Sumuran												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Perlakuan 1 (Virus ND + Ekstrak Daun Kemangi Konsentrasi 1 µg/mL)	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	C												
	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Perlakuan 2 (Virus ND + Ekstrak Daun Kemangi Konsentrasi 10 µg/mL)	E	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	F												
Perlakuan 3 (Virus ND + Ekstrak Daun Kemangi Konsentrasi 100 µg/mL)	G	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keterangan : X : terjadi hemaglutinasi ● : tidak terjadi hemaglutinasi													

Tabel 5. Hasil Uji Hemaglutinasi Senyawa *ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimide-5-carboxylate*

Perlakuan	Sumuran												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrol Positif : Virus ND + Senyawa Konsentrasi 100 µg/mL	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	X	X	●	X	X	X	X	X	X	X	●	X
	C												
Kontrol Positif : Virus ND + Senyawa Konsentrasi 10 µg/mL	D	●	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	E	X	X	X	●	X	X	X	X	X	X	X	X
	F												
Keterangan : X : terjadi hemaglutinasi ● : tidak terjadi hemaglutinasi													

Tabel 6. Hasil Uji Hemaglutinasi Kontrol Virus *Newcastle Disease*

Perlakuan	Sumuran												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kelompok kontrol virus	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keterangan : X : terjadi hemaglutinasi ● : tidak terjadi hemaglutinasi													

Tabel 7. Hasil Uji Hemaglutinasi Kontrol Negatif

Perlakuan	Sumuran												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kelompok kontrol negatif	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Keterangan : X : terjadi hemaglutinasi ● : tidak terjadi hemaglutinasi													

Uji hemaglutinasi dilakukan guna mengukur sejauh mana kemampuan partikel virus untuk mengikat asam sialat yang terkandung dalam eritrosit ayam. Kehadiran virus yang terikat sel darah merah membentuk struktur kisi keruh. Sebaliknya apabila eritrosit tidak terikat virus baik karena terhalang senyawa antivirus atau virus tidak terisolasi dalam allantois akan membentuk semacam tombol bulat

merah (dot) di tengah sumuran (McGinnes *et al.*, 2006). Virus *Newcastle Disease* ini menyandi 6 protein dan yang berperan sebagai marker pada uji ini adalah protein HN (hemagglutinin-neuraminidase). Protein H berperan dalam pengikatan pada eritrosit sehingga menjadi marker adanya virus atau antibodi terhadap virus, sedangkan N merupakan enzim yang berperan dalam pelepasan virus (Pudjiatmoko, 2012). Pengamatan hemaglutinasi ini mudah divisualisasi tanpa bantuan mikroskop.

Berdasarkan pengamatan yang tertulis pada tabel 4, pada telur yang dinokulasi virus dan ekstrak daun kemangi baik pada konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/mL tidak menunjukkan adanya dot di tengah sumuran. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kemangi dalam konsentrasi tersebut tidak memiliki aktivitas daya hambat terhadap virus *Newcastle Disease*. Pada tabel 5, pada telur yang diinokulasi virus dan senyawa kontrol antivirus *ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate* menunjukkan beberapa titik dot pada kedua konsentrasi diatas. Berdasarkan pengamatan, titik dot yang muncul pada kelompok kontrol positif ini terlihat samar dan kecil. Kekeruhan dan hasil samar menunjukkan ketidaksempurnaan ikatan antibody TAB dan eritrosit karena titer HA pada konsentrasi 100 µg/mL lebih tinggi daripada 10 µg/mL.

Pada tabel 6 kelompok virus ditunjukkan terjadi hemaglutinasi diseluruh sumuran. Hal ini menunjukkan adanya ikatan virus dan eritrosit darah ayam. Pada tabel 7 untuk kelompok kontrol negatif ditunjukkan adanya kekeruhan di seluruh sumuran. Namun pada kelompok ini tidak dapat dikatakan terjadi hemaglutinasi karena pada kontrol negatif tidak dilakukan inokulasi apapun pada telur ayam berembrio. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh eritrosit ayam yang tidak segar. Ketidaksegaran eritrosit ini disebabkan karena jarak waktu antara pengambilan darah ayam dan uji hemaglutinasi yang lama. Serta penggunaan eritrosit untuk uji hemaglutinasi tidak disesegerakan pasca proses sentrifugasi darah selesai walaupun sudah dimasukkan ke dalam kulkas. Waktu penyimpanan darah yang terlalu lama akan menyebabkan penurunan jumlah molekul-molekul pada darah (Handayani *et al.*, 2017).

Tabel 8. Perhitungan Titer Hemaglutinasi Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Titer Hemaglutinasi pada TAB ke-		Rerata Titer Hemaglutinasi
	1	2	
1 (1 µg/mL)	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²
2 (10 µg/mL)	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²
3 (100 µg/mL)	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²
Kontrol positif (100 µg/mL)	2 ¹²	2 ²	2 ⁷
Kontrol positif (10 µg/mL)	2 ⁰	2 ³	2 ^{1,5}
Kontrol virus	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²

Tabel 9. Persentase Daya Hambat Aktivitas Antivirus

Kelompok Perlakuan	Persen Daya Hambat pada TAB ke- (%)		Rerata Persen Daya Hambat (%)
	1	2	
1 (1 µg/mL)	0	0	0
2 (10 µg/mL)	0	0	0
3 (100 µg/mL)	0	0	0
Kontrol positif (100 µg/mL)	0	99,90	49,95
Kontrol positif (10 µg/mL)	99,98	99,80	99,89
Kontrol virus	0	0	0

Berdasarkan persentase daya hambat, ketiga seri konsentrasi ekstrak daun kemangi tidak memiliki aktivitas antivirus terhadap virus Newcastle Disease, sedangkan pada kontrol positif menggunakan senyawa antivirus *ethyl 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo 1,2,3,4 tetrahydropyrimidine-5-carboxylate* memiliki daya hambat sebesar 49,95% dan 99,89% pada masing-masing konsentrasi 100 µg/mL dan 10 µg/mL.

Faktor penyebab uji hemaglutinasi mengalami kegagalan atau hasil samar dapat dikategorikan menjadi beberapa kemungkinan. Selain kurang segarnya eritrosit ayam yang digunakan, lama penyimpanan dan suhu penyimpanan ekstrak dapat mempengaruhi kualitas ekstrak. Semakin tinggi dan lama penyimpanan ekstrak dapat menurunkan daya aktivitas dari ekstrak. Penyimpanan ekstrak pada suhu rendah 4°C memiliki kestabilan lebih besar daripada penyimpanan pada suhu ruang 35°C (Rahmawati, 2017). Kedua, kontaminasi pada proses pengujian dapat terjadi apabila alat dan reagen tidak dalam keadaan steril. Sebelum dilakukan perlakuan, perlu dipastikan semua alat laboratorium dipastikan dalam keadaan tersterilisasi baik menggunakan autoklaf atau oven (McGinnes *et al.*, 2006). Ketiga, adanya kemungkinan kontaminasi terhadap jamur menimbulkan semua sumuran mengalami hemaglutinasi dan positif palsu terhadap kontrol positif. Berdasarkan sebuah penelitian dari *Medical Mycology* menjelaskan bahwa jamur (dengan model *Trichosporon asahii*) dapat membentuk kompleks ragi-eritrosit menyebabkan hemaglutinasi dihadapan sel-sel hidup (Ichikawa *et al.*, 2019). Kontaminasi jamur dapat terjadi ketika kondisi inkubator yang kurang steril, terlalu lembab, kondisi telur tidak dibersihkan secara merata menggunakan antiseptik, dan kurang rapatnya penempelan solatip setelah telur ayam berembrio dilakukan inokulasi. Maka dari itu, penambahan fungizone sebesar 5 g/mL sangat diperlukan guna menghindari adanya kemungkinan kontaminasi jamur (Michael Haryadi and Asmara, 2002).

3.5 Uji Fitokimia

Tabel 10. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kemangi

Senyawa	Pereaksi	Hasil Uji	Keterangan
Flavonoid	Amil alkohol + Mg HCl	Terbentuk lapisan amil alkohol berwarna	+
Alkaloid	Reagen meyer	Tidak berbentuk endapan putih	-
Tanin	FeCl ₃ 5%	Berwarna abu kehitaman	-
Saponin	Aquadest hangat HCl	Tidak terbentuk busa	-
Terpenoid	Asam asetat anhidrat asam sulfat	Terbentuk cincin coklat kehitaman di tengah	+

Hasil uji fitokimia pada tabel 10 menunjukkan bahwa sampel Daun Kemangi (*Ocimi basilica f. citrate folium*) positif mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid. Identifikasi flavonoid ditandai dengan terbentuknya lapisan amil alkohol berwarna kuning, sedangkan pada terpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin berwarna coklat kekuningan (Julianto, 2019).

Daun kemangi memiliki banyak kandungan senyawa bahan alam seperti monoterpenoid (*carvone, cineole, fenchone, geraniol, linalool, myrcene and thujone*), sesquiterpenoid (*caryophyllene and farnesol*), triterpenoid (*ursolic acid*) and flavonoid (*apigenin*). Dalam beberapa penelitian menyebutkan bahwa komponen daun kemangi dengan spektrum aktivitas antivirus yang luas terdapat pada senyawa linalool, apigenin, dan asam ursolat. Dalam penelitian ini, asam ursolat menghambat *coxsackievirus* dan *enterovirus* pada proses infeksi dan replikasi virus (Chiang *et al*, 2005). Senyawa apigenin daun kemangi dinilai efektif digunakan untuk *treatment* COVID-19 karena kemampuan anti-inflamatorinya (Zannella *et al.*, 2021). Selain itu pada senyawa linalool memiliki efek antivirus terhadap virus RNA penyebab bronchitis (Drevinskas *et al.*, 2019).

4. PENUTUP

Hasil penelitian aktivitas antivirus ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimi basilica f. citrate folium*) tidak menunjukkan aktivitas antivirus terhadap virus *Newcastle Disease* baik pada konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, maupun 100 µg/mL dengan persentase daya hambat virus sebesar 0%. Pada kontrol positif senyawa antivirus *ethyl 4-(4-hydroxy-3- methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimide-5-carboxylate* memiliki aktivitas antivirus sebesar 49,95% pada konsentrasi 100 µg/mL dan 99,89% pada konsentrasi 10 µg/mL dengan kemungkinan diindikasikan adanya positif palsu. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melihat adanya faktor kontaminasi oleh jamur, pengecekan kemungkinan

reagen yang tidak steril, atau faktor kemungkinan lainnya guna diharapkan dapat melengkapi penelitian ini.

PERSANTUNAN

Ungkapan terimakasih peneliti ucapkan kepada semua pihak yang mendukung penelitian ini, baik yang memberikan fasilitas dan pelayanan pendidikan, membimbing, dan memberikan support serta dukungan hingga terselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Chiang L.C., Ng L.T., Cheng P.W., Chiang W. and Lin C.C., 2005, *Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of Ocimum basilicum*, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32 (10), 811–816.
- Dortmans J.C., Koch G., Rottier P.J. and Peeters B.P., 2011, *Virulence of newcastle disease virus: What is known so far?*, *Veterinary Research*, 42 (1), 1–11.
- Drevinskas T., Maruška A., Telksnys L., Hjerten S., Stankevičius M., Lelešius R., Mickiene R., Karpovaite A., Šalomska A., Tiso N. and Ragažinskiene O., 2019, *Chromatographic Data Segmentation Method: A Hybrid Analytical Approach for the Investigation of Antiviral Substances in Medicinal Plant Extracts*, *Analytical Chemistry*, 91 (1), 1080–1088.
- Duke J.A., 2018, *Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants*,
- Handayani E.M., Sukeksi A. and Santosa B., 2017, *Pengaruh Penundaan Pemeriksaan Spesimen Darah Pada Suhu Ruang, Ruang AC, Dan Lemari es Terhadap Jumlah Trombosit Eka*,
- Ichikawa T., Uchiyama K., Yoshizawa Y., Arai Y., Shimizu A. and Ikeda R., 2019, *Hemagglutination ability and hemolytic activity of Trichosporon Asahii*, *Medical Mycology*, 57 (4), 510–514.
- Julianto T.S., 2019, *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining fitokimia*,
- Kencana G.A.Y., 2017, *Modul Training Cara Mengisolasi Virus Dan Mengidentifikasi Dengan Uji Serologi Hemaglutinasi*,
- Kumalasari M.L.F. and Andiarna F., 2020, *Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kemangi (Ocimum basilicum L)*, *Indonesian Journal for Health Sciences*, 4 (1), 39.
- Kurniawan F.R., Arsana I.N. and Adiputra I.G.K., 2022, *Titer Hemaglutinasi dan Kematian Embrio pada Telur Spesific Antibody Negative (SAN) dengan Usia yang Berbeda Saat Inokulasi Virus Avian Influenza*, *Jurnal Peternakan*, 19 (1), 49.
- Mariani Y. and Hamzani M.A., 2021, *Pengaruh Suhu Penetasan Terhadap Fertilitas, Mortalitas dan Daya Tetas Telur Ayam Kampung (Gallus domesticus) Pada Inkubator*, *AGRIPTEK (Jurnal Agribisnis dan Peternakan)*, 1 (1), 23–28.
- McGinnes L.W., Pantua H., Reitter J. and Morrison T.G., 2006, *Newcastle disease virus: propagation, quantification, and storage*, *Current protocols in microbiology*, Chapter 15, 1–18.
- Michael Haryadi W.W. and Asmara, 2002, *Isolasi dan Propagasi Agen Penyebab Penyakit dari Kasus Terdiagnosa Penyakit Infektious Laryngotracheitis (ILT) pada Telor Ayam Berembrio*, *J. Sain Vet*, 20, 52–57.
- Onyebuchi C. and Kavaz D., 2020, *Effect of extraction temperature and solvent type on the bioactive potential of Ocimum gratissimum L. extracts*, *Scientific Reports*, 10 (1), 1–11. Terdapat di:

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78847-5>.

- Pudjiatmoko, 2012, *Manual Penyakit Unggas*, Terdapat di: https://www.academia.edu/download/52171901/Manual_Penyakit_Unggas.pdf.
- Rahmawati D.P., 2017, *Pengaruh Waktu dan Suhu Penyimpanan Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sembung (Blumea balsamifera L.) Univeritas Islam Negeri Syarif Hidayatullah*,.
- Remontara A.A.N., Kencana G.A.Y. and Suartha I.N., 2022, Titer Antibodi Sekunder Sebagai Respons Setelah Vaksinasi Aktif Penyakit Tetelo pada Ayam Petelur di Peraan, Tabanan, Bali, *Indonesia Medicus Veterinus*, 11 (1), 1–10.
- Widyawati P.S., 2017, Potensi Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) sebagai Penangkal Radikal Bebas DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil radical), *agriTECH*, 25 (3), 137.
- Zannella C., Giugliano R., Chianese A., Buonocore C., Vitale G.A., Sanna G., Sarno F., Manzin A., Nebbioso A., Termolino P., Altucci L., Galdiero M., de Pascale D. and Franci G., 2021, *Antiviral activity of vitis vinifera leaf extract against sars-cov-2 and hsv-1*, *Viruses*, 13 (7)